

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 927 240**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2017 PCT/IL2017/050129**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017 WO17134668**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2017 E 17747119 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022 EP 3411711**

(54) Título: **Tensión del retículo endoplásmico como herramienta de predicción en la terapia del cáncer y una terapia combinada para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

04.02.2016 US 201662291190 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2022

(73) Titular/es:

IMMUNE SYSTEM KEY LTD. (100.0%)
Rozenblat 318/7 St.
9746024 Jerusalem, IL

(72) Inventor/es:

**DEVARY, YORAM y
SANDLER, UZIEL**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 927 240 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tensión del retículo endoplásmico como herramienta de predicción en la terapia del cáncer y una terapia combinada para el tratamiento del cáncer

5 CAMPO TECNOLÓGICO

La presente divulgación se refiere a la terapia combinada y a los kits terapéuticos para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer.

10 TÉCNICA ANTECEDENTE

A continuación se enumeran las referencias que se consideran relevantes como antecedentes del objeto actualmente divulgado:

- 15 [1] Mehta, S. et al., 2010, Therapeutic Advances in Medical Oncology 2(2): 125-148.
- [2] Lee, A. S. 2007, Cancer Research 67(8): 3496-3499.
- [3] Zheng, Y. Z. et al., 2014, Breast Cancer Research and Treatment 145: 349-358.
- [4] Sato, M. et al., 2010, Advances in Genetics 69: 97-114.
- 20 [5] Han, K.S. et al., 2015, Oncotarget 6:34818-30.
- [6] WO 2008/042508.
- [7] US 2009/0181472.
- [8] WO 02/082076.
- [9] WO 02/077176.
- 25 [10] WO 2006/046239.
- [11] WO 2007/122622.
- [12] WO 2007/091240.
- [13] WO 2008/075349.
- 30 [14] Sandler, U. et al., 2010, Recent advances in clinical medicine, ISSN: 1790-5125.
- [15] Sandler, U. et al., 2010, J Experimental Therapeutics and Oncology 8:327-339.
- [16] WO 2015/083167.
- [17] Eisenhauer, E. A. et al., 2009, European Journal of Cancer 45: 228-247.

35 El reconocimiento de las referencias anteriores en el presente documeneto no debe inferirse en el sentido de que éstas sean de algún modo relevantes para la patentabilidad del objeto actualmente divulgado.

ANTECEDENTES

40 Los avances tecnológicos aumentaron en gran medida la comprensión de las bases moleculares de la progresión tumoral y hasta la fecha se han identificado numerosos biomarcadores tumorales y de respuesta al tratamiento (1).

45 Estos marcadores pueden dividirse generalmente en dos tipos, siendo los marcadores de pronóstico que tienen como objetivo evaluar objetivamente el resultado global del paciente, tal como la probabilidad de recurrencia del cáncer después del tratamiento estándar y los marcadores predictivos que tienen como objetivo evaluar la probabilidad de beneficio de una intervención clínica específica (1).

50 Entre los marcadores celulares implicados en el desarrollo y el pronóstico del cáncer se encuentra la proteína regulada por la glucosa GRP78, también denominada BiP (proteína de inmunoglobulina de unión), que reside principalmente en el retículo endoplásmico (RE). La GRP78, que pertenece a la familia de proteínas HSP70, facilita el correcto plegamiento de las proteínas, evita que los intermedios se agreguen y dirige las proteínas mal plegadas a la degradación del proteasoma. Además, GRP78 sirve como regulador de la señalización de la tensión del RE. La GRP78 promueve la proliferación tumoral, la supervivencia, la metástasis y la resistencia a una amplia variedad de terapias y, por tanto, la expresión del GRP78 puede servir como biomarcador del comportamiento tumoral y de la respuesta al tratamiento (2).

55 En consonancia con lo anterior, las células cancerosas se adaptan a la tensión crónica del entorno tumoral induciendo la expresión de GRP78 (2), que funciona como un potente factor antiapoptótico y confiere resistencia a los fármacos (3). De hecho, se ha demostrado que la presencia de autoanticuerpos contra la GRP78 en el suero de los pacientes con cáncer se asocia generalmente con un mal pronóstico (4). La regulación de GRP78/BiP tras la terapia antiangiogénica se ha demostrado en múltiples estudios. Por ejemplo, Han et al. (5), mostraron que el tratamiento con sunitinib indujo hipoxia en los xenoinjertos de Caki-1 que fue seguida por una elevada expresión de GRP78/BiP en el grupo tratado en comparación con el grupo de control.

60 Por lo tanto, la GRP78 se propuso como marcador para diversas condiciones, *entre otras cosas* para determinar si un sujeto con cáncer está en riesgo de desarrollar resistencia a la terapia hormonal (6), como marcador de pronóstico para evaluar el grado del tumor en el caso del cáncer de cabeza y cuello (7) o como marcador tumoral de diversos

cánceres (8, 9). Sin embargo, aún no está claro el mecanismo por el que GRP78 actúa durante la progresión del cáncer o el tratamiento del cáncer.

5 Se identificó previamente un péptido denominado "T101" que está codificado por un ADNc único para el timo humano. Este péptido, así como los derivados del mismo, fueron implicados, *entre otras cosas*, para el tratamiento del cáncer a través del papel de T101 como estimulador del sistema inmunitario (WO 2006/046239, 10). El documento WO 2006/046239 demuestra que T101 es capaz de estimular el sistema inmunitario y de reducir el tamaño del tumor, lo que sugiere que el péptido afecta a la proliferación de las células cancerosas. El documento WO 2006/046239 también sugiere un papel inmunológico para T101, por ejemplo, en la protección de los pacientes durante el curso de la 10 quimioterapia estándar.

El tratamiento del cáncer mediante el uso de T101 también se sugirió en el documento WO 2007/122622 (11), que demuestra, *entre otras cosas*, el efecto de T101 en el desarrollo de diversos tipos de tumores. El péptido T101 también 15 fue descrito en el documento WO 2007/091240 (12), relativo al tratamiento de enfermedades inmunológicas y en el documento WO 2008/075349 (13), así como en las publicaciones de Sandler et al. (14 y 15), relativas al tratamiento o la prevención de una enfermedad que afecta a una célula que tiene un receptor T1/ST2.

20 Además, se ha informado de que un derivado peptídico de T101, denominado "Nerofe", disminuye la secreción de proteínas que se sabe que están asociadas a la metástasis del cáncer por parte de las células cancerosas y que inhibe directamente la migración de las células cancerosas *in vitro*. Además, se demostró que el péptido afecta al nivel sérico del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en pacientes con cáncer (WO 2015/083167, 16), y se sugirió su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de la metástasis del cáncer.

DESCRIPCIÓN GENERAL

25 La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una terapia de combinación que comprende un agente anticáncer y 30 un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del péptido aislado para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer.

Más específicamente, el agente anticáncer se selecciona de Taxol doxorrubicina.

35 En algunas realizaciones, el agente anticáncer es Taxol.

En otras realizaciones, el agente anticáncer es la doxorrubicina.

En ciertas realizaciones, el péptido aislado y el agente anticáncer se administran de forma concomitante o 40 consecutiva.

45 En algunas realizaciones, el cáncer es n cáncer de páncreas, cáncer de ovario, neoplasia de células fusiformes de origen neural, neoplasia de células fusiformes, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, adenocarcinoma de colon, cáncer de recto, adenocarcinoma de recto, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, neoplasia de medula espinal, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer renal, mieloma múltiple, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer del intestino delgado, carcinoma hepático, cáncer de hígado o neoplasias del tracto genital femenino.

50 En algunas realizaciones, el péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra: **a)** a una dosis de 5 mg/m² a 100 mg/m², y/o **b)** a una frecuencia de una, dos o tres veces por semana.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit terapéutico que comprende: **(a)** un agente anticancerígeno seleccionado de Taxol y doxorrubicina; y **(b)** un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado. En algunas realizaciones el agente anticáncer es Taxol.

60 En otras realizaciones, el agente anticáncer es la doxorrubicina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 Para comprender mejor el objeto que se divulga en el presente documento y para ejemplificar cómo puede llevase a cabo en la práctica, a continuación, se describirán realizaciones, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 **La Fig. 1** es un sumario de la aleatorización y asignación de los pacientes, mostrando el número de pacientes y la asignación a una cohorte específica, así como la dosificación utilizada en el estudio.
- 10 **La Fig. 2A - Fig. 2B** son micrografías de una biopsia tomada de un paciente designado 002-006 que sufre una neoplasia de la médula espinal. La Fig. 2A describe la tinción de la proteína inmunoglobulina de unión (BiP) de una biopsia obtenida del paciente antes de recibir dTCapF y la Fig. 2B describe la tinción de BiP de una biopsia obtenida después de 11 meses de tratamiento con dTCapF. El anticuerpo utilizado para la tinción fue un anticuerpo anti-BiP (Abcam).
- 15 **La Fig. 3** es un gráfico que muestra la correlación entre el cambio en el nivel sérico de la BiP del marcador de tensión del RE y la dosis de dTCapF.
- 20 **La Fig. 4** es un gráfico que muestra la correlación entre el cambio en el nivel sérico de la BiP del marcador de tensión del RE y el cambio en el tamaño del tumor.
- 25 **La Fig. 5** es un gráfico que muestra el número de días de participación en el ensayo clínico de los pacientes de acuerdo con su expresión T1/ST2.
- 30 **La Fig. 6** es un gráfico que muestra la correlación entre el cambio en el nivel sérico de la BiP del marcador de tensión del RE y el cambio en el tamaño del tumor para las poblaciones negativas a ST2 y positivas a ST2.
- 35 **La Fig. 7** es un gráfico que muestra las concentraciones séricas de dTCapF a lo largo del tiempo por grupos de dosis. Las barras de error representan la DE.
- 40 **La Fig. 8** es un gráfico que muestra la correlación entre los cambios en el tamaño del tumor y la dosis administrada de dTCapF.
- 45 **Las Fig. 9A - Fig. 9D** son imágenes de inmunocitoquímica que utilizan un anticuerpo dirigido a β -cop de células OV90 de control (Fig. 9A), de células OV90 tratadas con el péptido dTCapF como se indica (Fig. 9B), de células OV90 inactivas (KO) de control (Fig. 9C) y de células OV90 inactivas (KO) tratadas con el péptido dTCapF como se indica (Fig. 9D).
- 50 **Las Fig. 10A - Fig. 10D** son imágenes de inmunocitoquímica que utilizan un anticuerpo dirigido a GRP78 BiP de células OV90 de control (Fig. 10A), de células OV90 tratadas con el péptido dTCapF como se indica (Fig. 10B), de células OV90 inactivas (KO) de control (Fig. 10C) y de células OV90 inactivas (KO) tratadas con el péptido dTCapF como se indica (Fig. 10D).
- 55 **Las Fig. 11A - Fig. 11B** son gráficos de barras que muestran el nivel de CRT en suero en los pacientes tratados con dTCapF al final del tratamiento (Fig. 11A) y el cambio en el nivel de CRT en los pacientes tratados con dTCapF (Fig. 11B).
- 60 **La Fig. 12** es un gráfico que muestra la activación de las células asesinas naturales (células NK) en presencia de dTCapF.
- 65 **Las Fig. 13A - Fig. 13B** son gráficos de barras que muestran el nivel de incorporación de BrdU en células de cáncer de ovario humano (Fig. 13A) y células de cáncer de páncreas humano (Fig. 13B) en presencia de Taxol (2 nM o 4 nM), dTCapF (25 μ g/ml) o una combinación de los mismos (dTCapF a 25 μ g/ml y Taxol a 2 o 4 nM).

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

- 65 La presente divulgación se basa en el sorprendente hallazgo de que el tratamiento con el péptido denominado en el presente documento dTCapF (o Nerofe), que tiene la secuencia de aminoácidos todo D de Trp Trp Thr Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys (denotado por SEQ ID NO: 1) aumentó la tensión del retículo endoplásmico (RE) en una variedad de cánceres, como lo demuestra el aumento del nivel de expresión de la proteína de inmunoglobulina de unión al marcador de tensión del RE (BiP). Sorprendentemente, el aumento observado en la BiP del marcador de tensión del RE se correlacionó con una inhibición del crecimiento tumoral en los pacientes tratados con dTCapF, como demostró la disminución del tamaño del tumor al final del periodo de tratamiento.
- 70 Así, *entre otras cosas*, la presente divulgación muestra que un marcador de tensión del RE, por ejemplo, BiP, puede utilizarse como biomarcador para evaluar el efecto del tratamiento con el péptido dTCapF en pacientes con cáncer.
- 75 Como se indicó anteriormente, la presente divulgación se basa en el sorprendente hallazgo de que el tratamiento con el péptido dTCapF (denotado por SEQ ID NO: 1) aumentó la tensión en el retículo endoplásmico (RE) en los tumores obtenidos de una variedad de pacientes con cáncer, en correlación con la respuesta positiva de los pacientes al tratamiento. El RE tiene un papel importante en el plegado y la maduración de las proteínas recién sintetizadas. La tensión del RE, como se conoce en la técnica, se refiere a la alteración de la homeostasis del RE que se manifiesta por la acumulación de proteínas mal plegadas y desplegadas en el RE. La tensión del RE activa complejas redes de señalización, por ejemplo la red denominada Respuesta de Proteínas no Plegadas (UPR), que actúa para reducir la tensión del RE y restaurar la homeostasis.

80 [La respuesta a las proteínas no plegadas (UPR) es iniciada por tres proteínas transmembrana del RE: Requerimiento 1 de Inositol (IRE1), quinasa del RE similar a la PKR (PERK), y Factor de Transcripción Activador 6 (ATF6). Bajo condiciones no tensionadas, la chaperona del RE, la proteína de unión a la inmunoglobulina (BiP) se une a los dominios luminales de estos reguladores maestros manteniéndolos inactivos. En caso de tensión del RE, la BiP se disocia de estos sensores, lo que provoca su activación.

5 La UPR activada regula los efectores descendentes con las siguientes tres funciones distintas: respuesta adaptativa, control de retroalimentación y regulación del destino celular. La respuesta adaptativa de la UPR incluye , entre otras cosas, la regulación al alza de las chaperonas moleculares y las enzimas de procesamiento de proteínas para aumentar el plegado. El control de retroalimentación implica la regulación negativa de la activación de la UPR a medida que se restablece la homeostasis del RE. La regulación del destino celular por parte de la UPR desempeña un papel importante en la patogénesis de los trastornos relacionados con la tensión del RE. Como se sabe en la técnica, cuando la célula se encuentra con la tensión del RE que la UPR puede mitigar, la célula sobrevivirá. Sin embargo, durante las 10 condiciones de tensión del RE no solucionable, la UPR no logra reducir la tensión del RE y restaurar la homeostasis, promoviendo la muerte celular.

15 Otras vías asociadas a la tensión del RE son la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD), que es una vía celular orientada a las proteínas mal plegadas del retículo endoplásmico para su ubiquitinación y posterior degradación por un complejo de degradación de proteínas (concretamente el proteasoma) y la apoptosis mediada por la tensión del RE.

20 Por lo tanto, el término "**marcador de tensión del retículo endoplásmico**" o "**marcador de tensión del RE**" se refiere a cualquier molécula asociada con la respuesta a la tensión del retículo endoplásmico, por ejemplo, pero sin limitarse a cualquier molécula asociada con la red de señalización denominada respuesta a las proteínas no plegadas (UPR) que actúa para reducir la tensión del RE y restaurar la homeostasis, cualquier molécula asociada con la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) o cualquier molécula asociada con la apoptosis mediada por la tensión del RE.

25 En algunas realizaciones, el marcador de tensión del RE, tal como se define en el presente documento, es la proteína regulada por la glucosa (GRP-78), también denominada proteína de inmunoglobulina de unión (BiP), el Requerimiento 1 de Inositol 1 (IRE1), la quinasa del RE similar a la PKR (PERK), la subunidad α del factor 2 de iniciación eucariota (eIF2 α), el factor de transcripción transmembrana del RE de tipo II (ATF6) o la proteína homóloga de C/EBP (CHOP).

30 Como se ha detallado anteriormente, se detectó un aumento del nivel de expresión del marcador del ER de la proteína inmunoglobulina de unión (BiP) en los pacientes administrados con el péptido dTCAPF, en correlación con una inhibición del crecimiento tumoral en estos pacientes.

35 El término "**proteína de inmunoglobulina de unión**" (BiP), también conocida como proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP-78) o proteína de choque térmico de 70 kDa (HSPA5), se refiere a una proteína que en los humanos está codificada por el gen HSPA5 y que actúa como chaperona molecular localizada en el lumen del retículo endoplásmico (RE). La BiP se une a las proteínas recién sintetizadas cuando son translocadas al RE y las mantiene en un estado competente para su posterior plegado y oligomerización. La BiP también es un componente esencial de la maquinaria de translocación, y desempeña un papel en el transporte a través de la membrana del RE de las proteínas aberrantes destinadas a la degradación por el proteasoma. La BiP es una proteína abundante en todas las 40 condiciones de crecimiento, pero su síntesis está marcadamente inducida en condiciones que conducen a la acumulación de polipéptidos no plegados en el RE. En realizaciones específicas de la presente divulgación, la BiP es una BiP humana, con el número de acceso UniProtKB P11021.

45 Como se describe en los Ejemplos siguientes, también se examinó el efecto de los dTCAPF en las células asesinas naturales (NK) humanas. Como se muestra en la Figura 12, los dTCAPF indujeron un aumento de la expresión de los receptores CD335 y CD337. Las células asesinas naturales proporcionan una respuesta rápida a las células infectadas por virus y responden a la formación de tumores. Sin querer ceñirnos a la teoría, la activación de los receptores CD335 y CD337 por parte de los dTCAPF está asociada al aumento de la tensión del RE en estas células. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la medición de la tensión de RE puede llevarse a cabo en las células de los pacientes, por ejemplo, las células NK. De acuerdo con los resultados mostrados en el Ejemplo 1 a continuación, se observó una clara diferencia en el nivel de BiP en una biopsia obtenida de un paciente con neoplasia de la médula espinal antes de iniciar el tratamiento (Figura 2A) en comparación con el nivel de BiP observado en una biopsia obtenida del mismo paciente después de 11 meses de tratamiento (Figura 2B). Los resultados anteriores demuestran que el péptido dTCAPF aumentó la tensión del RE en los tumores obtenidos de un paciente con cáncer de la médula espinal.

55 Además, los resultados mostrados en el Ejemplo 2 a continuación demuestran que un aumento en el nivel de BiP se correlacionó con la inhibición completa del crecimiento tumoral en pacientes que tienen diferentes tipos de cáncer que fueron tratados con el péptido dTCAPF bajo las condiciones especificadas en el presente documento.

60 Tal y como se utiliza en el presente documento para describir la presente divulgación, "**cáncer**" o "**tumor**" se refieren de forma equivalente a una hiperplasia de un tejido u órgano. Si el tejido forma parte del sistema linfático o inmunitario, las células malignas pueden incluir tumores no sólidos de células circulantes. Las neoplasias de otros tejidos u órganos pueden producir tumores sólidos. En general, los procedimientos y composiciones de la presente divulgación pueden utilizarse en el tratamiento de tumores sólidos y no sólidos.

65 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de ovario,

- 5 neoplasia de células fusiformes de origen neural, neoplasia de células fusiformes, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, adenocarcinoma de colon, cáncer rectal, adenocarcinoma rectal, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, neoplasia de médula espinal, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer renal, mieloma múltiple, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, carcinoma hepático, cáncer de hígado y neoplasias del aparato genital femenino.
- 10 En otras realizaciones de la presente divulgación, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una neoplasia de células fusiformes de origen neural, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de recto, cáncer de páncreas y neoplasia de la médula espinal.
- 15 En el estudio clínico descrito a continuación se encontró una correlación entre la actividad antitumoral de los dTCApF y el estado de expresión T1/ST2 en las células tumorales de los pacientes. Se encontró una correlación directa entre la positividad de T1/ST2, los cambios de tamaño del tumor y la inducción de la tensión del RE. Estos resultados son consistentes con los estudios preclínicos descritos más adelante en el Ejemplo 4, que muestran que la incubación de células OV-90 con gen ST2 inactivado con dTCApF no produjo tensión del RE. Sin querer estar limitado por la teoría, estas observaciones sugieren que el receptor T1/ST2 puede ser un biomarcador para seleccionar a los pacientes positivos a T1/ST2 que tienen más probabilidades de responder positivamente a los dTCApF.
- 20 20 El péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado puede administrarse por cualquier vía de administración conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, por vía intravenosa (iv).
- 25 25 El péptido aislado, tal como se define en el presente documento, puede administrarse en una "**cantidad efectiva**" tal que sea necesaria para lograr el resultado terapéutico deseado. La "cantidad efectiva" se determina en función de la gravedad de la enfermedad junto con los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el estado general del paciente (edad, sexo, peso y otras consideraciones conocidas por el médico que lo atiende).
- 30 30 Como se detalla a continuación, los inventores están llevando a cabo un ensayo clínico en curso, de acuerdo con el cual se determinó el tipo de cáncer, la dosis, la frecuencia de administración, la duración del tratamiento y otros parámetros. Como se detalla a continuación, el régimen de dosificación fue de 6, 12, 24, 48 o 96 mg/m² (por ejemplo, como se muestra en la Figura 1).
- 35 35 En diversas realizaciones el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m², 90 mg/m², 80 mg/m², 70 mg/m², 60 mg/m² o aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 50 mg/m².
- 40 40 En otras realizaciones específicas, el péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado se administra con una frecuencia de 3 veces por semana.
- 45 45 Como se exemplifica a continuación, el tratamiento con dTCApF (a 6, 12, 24, 48 y 96 mg/m², 3 veces/semana, en ciclos consecutivos de 28 días) en tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos fue seguro y bien tolerado, con una PK lineal y dependiente de la dosis. Los dTCApF suprimieron los factores antigenicos, indujeron la producción de citoquinas anticancerígenas y el estrés del RE, lo que probablemente condujo al resultado clínico observado en algunos de los pacientes. La tinción positiva a T1/ST2 podría servir como marcador predictivo de la respuesta a los dTCApF.
- 50 50 Por lo tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente que necesita el mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1, un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aislado es aproximadamente 6, 12, 24, 48 o 96 mg/m². En otras realizaciones, el péptido aislado se administra tres veces por semana durante un período de al menos cuatro semanas consecutivas. En otras realizaciones específicas, el péptido aislado es el péptido denominado en el presente documento dTCApF que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO: 1.
- 60 60 En otras realizaciones específicas, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aislado es aproximadamente 24, 48 o 96mg/m² o superior. En otras realizaciones específicas, la cantidad terapéuticamente eficaz es aproximadamente 24 mg/m² (o superior), durante un período de al menos aproximadamente cuatro semanas, y el paciente es administrado además con el péptido aislado en una cantidad terapéuticamente eficaz superior de aproximadamente 48, 96mg/m² o superior.
- 65 65 Los términos "**tratar**", "**que trata**", "**tratamiento**" , tal y como se utilizan en el presente documento, significan mejorar, aliviar o eliminar uno o más parámetros clínicos, síntomas o indicaciones de actividad de la enfermedad en un paciente

con cáncer. Los parámetros clínicos asociados con el cáncer, tal como se conocen en la técnica y se han detallado anteriormente, son, por ejemplo, el tamaño del tumor, el crecimiento del tumor, el número de tumores, los marcadores de la enfermedad, la metástasis de las células tumorales, etc. Por "**paciente**" se entiende cualquier mamífero para el que se desea la administración del péptido aislado tal como se define en el presente documento, o cualquier composición farmacéutica de la invención, en concreto pacientes afectados por el cáncer tal como se define en el presente documento, en particular pacientes humanos.

El seguimiento del tratamiento, tal como se define en el presente documento, puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido en la técnica para el seguimiento de la respuesta del paciente con cáncer al tratamiento, por ejemplo, de acuerdo con la directriz RECIST (17).

Como se detalla a continuación, la presente divulgación se refiere, *entre otras cosas*, a los resultados asociados con un ensayo clínico en curso realizado con el péptido dTCAPF, que tiene la secuencia de aminoácidos todo D de Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys (como se denota por SEQ ID NO: 1).

El término "**péptido aislado**", tal como se define en el presente documento, abarca un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 (es decir, la secuencia de aminoácidos Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys en una conformación totalmente D), denominada en el presente documento "dTCAPF" o "Nerofe" y los derivados funcionales de la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido aislado.

Cualquier sal farmacéuticamente aceptable del péptido aislado, tal como se define en el presente documento, está comprendida en la presente divulgación, en particular la sal de acetato del péptido.

En alguna realización el péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1, que tiene la secuencia de aminoácidos todo D de Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys. En realizaciones específicas, el péptido aislado de acuerdo con la presente divulgación es una sal farmacéuticamente aceptable de la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1, por ejemplo, la sal de acetato del mismo.

El término "**péptido**", tal como se define en el presente documento, se refiere a una cadena molecular de residuos de aminoácidos que, si es necesario, puede modificarse en cada uno de sus residuos de aminoácidos, por ejemplo, mediante manosilación, glicosilación, amidación (por ejemplo, amidas C-terminales), carboxilación o fosforilación. El péptido puede obtenerse sintéticamente, a través de procedimientos de ingeniería genética, expresión en una célula huésped, o a través de cualquier otro medio adecuado. Los procedimientos para producir péptidos son bien conocidos en la técnica.

El término "**aislado**" se refiere a las moléculas, tal como las secuencias de aminoácidos o los péptidos que se retiran de su entorno natural, se aíslan o se separan.

El término "**aminoácido**", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos naturales y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fososerina.

El término aminoácido abarca los L-aminoácidos y los D-aminoácidos, que son imágenes especulares de los L-aminoácidos, donde la quiralidad en el carbono alfa se ha invertido. Los D-aminoácidos son muy resistentes a la degradación mediada por las proteasas y tienen una baja respuesta inmunogénica.

Los términos "**secuencia de aminoácidos**" o "**secuencia de péptidos**" también se refieren al orden en el que los residuos de aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos, se encuentran en la cadena en péptidos y proteínas. La secuencia se reporta generalmente desde el terminal N que contiene el grupo amino libre hasta el terminal C que contiene el grupo carboxilo libre.

Por el término "**que comprende**" se entiende que el péptido aislado de acuerdo con la presente divulgación incluye el péptido denotado por SEQ ID NO: 1, pero también puede incluir residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N o en el extremo C del péptido o en ambos extremos.

Como se indicó anteriormente, la presente divulgación también abarca péptidos aislados que comprenden derivados del péptido que tienen la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1.

Por el término "**derivado**" o "**derivados**" se entiende que se incluyen los péptidos, que comprenden la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO: 1, pero que difieren en uno o más aminoácidos en su secuencia global, es decir, que tienen supresiones, sustituciones (por ejemplo, sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido), inversiones o adiciones dentro de la secuencia global de SEQ ID NO: 1. Este término también abarca la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la secuencia global por su respectivo residuo de aminoácido L.

En realizaciones particulares, la presente divulgación se refiere a un derivado funcional de la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1, en la que dicho derivado funcional tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, más preferentemente 95%, en particular 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO: 1.

5 *Las "sustituciones" de aminoácidos* son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de la similitud de la polaridad, la carga, la solubilidad, 10 la hidrofobicidad, la hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 10 1) Alanina (A), Glicina (G);
 15 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
 20 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 7) Serina (S), Treonina (T); y
 8) Cisteína (C), Metionina (M).

25 Se aprecia que estos derivados peptídicos no deben alterar la actividad biológica del péptido original. El término "**funcional**" significa que el péptido modificado (es decir, el derivado) conserva una actividad biológica cualitativamente similar a la del péptido no modificado. La actividad biológica del derivado puede determinarse como se describe en el presente documento, es decir, monitorizando el efecto de dicho derivado tras su administración a un modelo animal, como se conoce en la técnica.

30 En algunas realizaciones, el péptido aislado, tal como se define en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está comprendido en una composición farmacéutica.

35 El término "**composiciones farmacéuticas**", tal como se define en el presente documento, se refiere al péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado y, opcionalmente, al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable como se conoce en la técnica. Tal y como se utiliza en el presente documento, el "**portador farmacéuticamente aceptable**" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Salvo que algún medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica.

40 Las composiciones farmacéuticas utilizadas para tratar a los sujetos que necesitan las mismas de acuerdo con la presente divulgación comprenden opcionalmente también un agente amortiguador, un agente que ajusta la osmolaridad de las mismas, y opcionalmente, uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica.

45 Las composiciones farmacéuticas utilizadas para tratar a los sujetos que necesitan las mismas de acuerdo con la invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica, por ejemplo, como se detalla en los Ejemplos siguientes.

50 Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados en el presente documento, las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir también otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

55 Por el término "**agente de detección específico para determinar el valor de expresión**" de al menos un marcador de tensión de RE se entiende cualquier agente de detección específico para un marcador de tensión de RE como se define en el presente documento y, opcionalmente, un agente de detección adicional específico para determinar el nivel de expresión de al menos un gen de referencia de control adecuado, como se define anteriormente.

60 La muestra de control puede comprender una muestra biológica o cualquier polipéptido/ácido nucleico derivado de ella.

65 En otra realización, el kit de acuerdo con la presente divulgación comprende, además:
 (d) un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado.

En otras realizaciones, el kit de acuerdo con la presente divulgación comprende además instrucciones de uso.

- La mayoría de los agentes anticancerígenos son medicamentos fuertes que tienen un intervalo de dosis bastante estrecho por razones de seguridad y eficacia. Tomar muy poco de un agente no tratará bien el cáncer y tomar demasiado puede causar efectos secundarios que pongan en peligro la vida. La quimioterapia es conocida por los efectos adversos que conlleva. Los efectos secundarios más comunes son, entre otros, fatiga, dolor, llagas en la boca y la garganta, diarrea, náuseas y vómitos. Por lo tanto, es deseable que haya formas de limitar o reducir las dosis de los agentes quimioterapéuticos administrados.
- Como se indica a continuación, el efecto terapéutico beneficioso del péptido dTCAPF en las células cancerosas y la comprensión de su asociación única con la tensión del RE sirvieron de base para otro aspecto de la presente invención, de acuerdo con el cual el dTCAPF se combina con otro agente terapéutico anticanceroso. Sin querer ceñirse a la teoría, como consecuencia del efecto de los dTCAPF sobre la tensión del RE, los dTCAPF pueden permitir una reducción significativa de la cantidad administrada de un agente anticancerígeno adicional, y así reducir indirectamente los efectos secundarios asociados al mismo mientras se mantiene el efecto antitumoral del fármaco.
- A continuación se describe un estudio en el que se administró dTCAPF en combinación con un agente terapéutico anticanceroso adicional, por ejemplo, Taxol. Sorprendentemente, mientras que cada uno de los agentes, es decir, dTCAPF y Taxol, sólo tenía un efecto marginal sobre la viabilidad celular, la combinación de dTCAPF con Taxol dio lugar a un efecto sinérgico y a una reducción sustancial de la viabilidad celular. Por lo tanto, la combinación de dTCAPF con un agente anticancerígeno permite la reducción de la dosis estándar administrada del agente anticancerígeno durante la terapia del cáncer.
- Por lo tanto, de acuerdo con otro de sus aspectos, la presente divulgación proporciona una terapia combinada que comprende un agente anticanceroso y un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que dicho agente anticanceroso se administra a una dosis inferior a la dosis estándar de cuidado de dicho agente anticanceroso.
- El término "**terapia combinada**", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la administración concomitante (simultánea) o consecutiva de dos o más agentes, es decir, un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo y un agente anticancerígeno. Por ejemplo, la administración concurrente puede significar una forma de dosificación que contenga los dos o más agentes o la administración de una mezcla de los dos o más agentes, mientras que la administración consecutiva significa formas de dosificación separadas que se administran al paciente en diferentes momentos e incluso por diferentes vías de administración.
- Así, en algunas realizaciones de la presente divulgación, el péptido aislado de la invención y dicho agente anticanceroso se administran de forma concomitante o consecutiva.
- Por lo tanto, el término "**dosis estándar de cuidado de dicho agente anticanceroso**", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una dosis recomendada por un médico experto para el tratamiento de un determinado tipo de cáncer en un paciente con cáncer, con base en consideraciones tales como los agentes anticancerosos que se van a administrar, la edad del paciente, el género, el peso y los parámetros clínicos relevantes asociados con la enfermedad y el estado de salud general del paciente. Mientras que algunos agentes anticancerígenos se determinan de acuerdo con el peso corporal del paciente en kilogramos, para algunos agentes anticancerígenos las dosis se determinan con base en la superficie corporal (BSA), que los médicos calculan utilizando la altura y el peso. La BSA se expresa en metros cuadrados (m^2). Las dosificaciones para niños y adultos difieren, incluso después de tener en cuenta el BSA.
- Como se indica a continuación, la combinación del péptido dTCAPF con Taxol produjo un efecto sinérgico y una reducción sustancial de la viabilidad celular. Por lo tanto, una terapia combinada del péptido dTCAPF con un agente anticanceroso puede permitir la reducción de la dosis estándar administrada del agente anticanceroso durante la terapia del cáncer.
- En algunas realizaciones de la presente divulgación, la terapia combinada para su uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que la dosis administrada de dicho agente anticanceroso es inferior a la dosis estándar de cuidado de dicho agente anticanceroso en al menos aproximadamente 1 %-50 %, 5 %-45 %, aproximadamente 10 %-40 %, aproximadamente 15 %-35 % o aproximadamente 20 %-30 %.
- El término "**agente anticanceroso**", también conocido como "fármaco anticanceroso" o "fármaco antineoplásico", se utiliza en su sentido más amplio y abarca cualquier fármaco o agente que sea eficaz en el tratamiento de enfermedades malignas o cancerosas. Existen varias clases de fármacos contra el cáncer, *entre otras cosas*, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida), antimetabolitos (por ejemplo, 5FU), productos naturales, agentes inmunoterapéuticos, hormonas e inhibidores.
- En algunas realizaciones, el agente anticanceroso de acuerdo con la presente divulgación es un agente

- quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa, un agente de inmunoterapia (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monoclonal que regula a la baja los receptores inmunitarios inhibidores), un agente hormonal, un agente biológico, un factor de diferenciación, un factor antiangiogénico, un agente antiautofagia o un agente inmunoestimulador.
- 5 Un "**agente quimioterapéutico**", como se conoce en la técnica, es un fármaco que se dirige a las células en diferentes fases del procedimiento de formación de nuevas células. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos (por ejemplo, 5-FU), antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos (por ejemplo, Paclitaxel o Taxol) o corticosteroides, por nombrar sólo algunos.
- 10 El término "**inhibidor de tirosina quinasa**", tal como se conoce en la técnica, se refiere a un fármaco que inhibe las tirosina quinasa. Las tirosina quinasa son enzimas responsables de la activación de muchas proteínas mediante cascadas de transducción de señales. Las proteínas se activan añadiendo un grupo fosfato a la proteína (fosforilación), un paso que los inhibidores de la tirosina quinasa inhiben.
- 15 Los términos "**un agente de inmunoterapia**" o "**agente inmunoestimulador**" en el contexto de la presente divulgación se refieren a la inmunoterapia del cáncer, que intenta estimular el sistema inmunitario para destruir los tumores.
- 20 El término "**agente biológico**" en el contexto del tratamiento del cáncer tal como se conoce en la técnica (a veces denominado "inmunoterapia") implica el uso de organismos vivos, sustancias derivadas de organismos vivos o versiones de dichas sustancias producidas en laboratorio para tratar la enfermedad. Algunas terapias biológicas contra el cáncer utilizan vacunas o bacterias para estimular el sistema inmunitario del organismo para que actúe contra las células cancerosas. Las terapias biológicas que interfieren con moléculas específicas implicadas en el crecimiento y la progresión del tumor también se denominan terapias dirigidas.
- 25 El término "**factor antiangiogénico**", tal como se conoce en la técnica, se refiere a un agente que interfiere con la angiogénesis, el procedimiento de creación de nuevos vasos sanguíneos. Los agentes antiangiogénicos son tipos de terapia dirigida que utilizan fármacos u otras sustancias para impedir que los tumores creen los nuevos vasos sanguíneos que necesitan para seguir creciendo.
- 30 El término "**agente antiautofagia**", tal como se conoce en la técnica, se refiere a un fármaco que interfiere con el procedimiento de autofagia, es decir, el mecanismo regulado y destructivo de la célula que desensambla los componentes innecesarios o disfuncionales (por ejemplo, bleomicina, doxorrubicina).
- 35 En otras realizaciones, el agente anticanceroso de acuerdo con la presente divulgación es un agente quimioterapéutico, un inhibidor de la tirosina quinasa, un agente de inmunoterapia, un agente hormonal, un agente biológico, un factor de diferenciación, un factor antiangiogénico, un agente antiautofagia o un agente inmunoestimulante
- 40 En realizaciones específicas, el agente anticanceroso es Taxol.
- 45 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una terapia de combinación que comprende un agente anticanceroso y un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que dicho agente anticanceroso se administra a una dosis inferior a la dosis estándar de dicho agente anticanceroso.
- 50 En otras realizaciones específicas la presente divulgación proporciona una terapia de combinación que comprende taxol y un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que el taxol se administra a una dosis inferior a la dosis estándar de dicho agente anticanceroso.
- 55 En algunas realizaciones, el péptido aislado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m².
- 60 En otras realizaciones, el péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra con una frecuencia de una, dos o tres veces por semana. En realizaciones específicas, el péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra con una frecuencia de tres veces por semana.
- 65 En otras realizaciones, el péptido aislado, el agente anticancerígeno o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo, juntos o por separado, están comprendidos en una composición farmacéutica.
- En algunas realizaciones, la terapia combinada para su uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de ovario, neoplasia de células fusiformes de origen neural, neoplasia de células

fusiformes, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, adenocarcinoma de colon, cáncer de recto, adenocarcinoma de recto, cáncer de pulmón, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, neoplasia medular, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer renal, mieloma múltiple, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, carcinoma hepático, cáncer de hígado o neoplasias del tracto genital femenino.

5 En otras realizaciones, la terapia de combinación para uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho cáncer es cáncer de ovario o cáncer de páncreas. En otras realizaciones, la terapia combinada para su uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho cáncer es cáncer de mama, preferentemente en la que dicho cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (TNBC).

10 En otras realizaciones, la terapia combinada para uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho cáncer comprende células cancerosas positivas a ST2.

15 En otras realizaciones, la terapia combinada para su uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En otras realizaciones, la terapia combinada para uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m².

25 En otras realizaciones, la terapia combinada para uso de acuerdo con la presente divulgación es en la que dicho péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra con una frecuencia de una, dos o tres veces por semana.

La presente divulgación proporciona además un kit terapéutico que comprende:

- 30 (a) un agente anticanceroso; y
 (b) un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO. 1 o un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado.

35 En algunas realizaciones, el kit terapéutico, tal como se define en el presente documento, comprende además instrucciones de uso.

40 En algunas realizaciones, el kit terapéutico tal como se divulga en el presente documento se utiliza en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que dicho agente anticanceroso se administra a una dosis inferior a la dosis estándar de cuidado de dicho agente anticanceroso.

45 La presente divulgación proporciona además un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente que necesita el mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 un derivado funcional del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado en combinación con un agente anticanceroso, en el que dicho péptido aislado reduce la dosis administrada estándar de dicho agente anticanceroso.

50 El término "**aproximadamente**", tal y como se utiliza en el presente documento, indica valores que pueden desviarse hasta 1 %, más concretamente 5 %, más concretamente 10 %, más concretamente 15 %, y en algunos casos hasta 20 % por encima o por debajo del valor al que se hace referencia, incluyendo el intervalo de desviación valores enteros y, si procede, también valores no enteros, constituyendo un intervalo continuo.

55 Divulgada y descrita, debe entenderse que esta invención no está limitada a los ejemplos particulares, los pasos de los procedimientos y las composiciones divulgadas en el presente documento, ya que dichos pasos de los procedimientos y las composiciones pueden variar un poco. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se utiliza con el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de los mismos.

60 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye, pero no se limita a". Este término abarca los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

65 La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o el procedimiento puede incluir ingredientes y/o pasos adicionales, pero sólo si los ingredientes y/o pasos adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o el procedimiento reivindicados. A lo largo de esta memoria descriptiva y de los Ejemplos y reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", y las variaciones como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "procedimiento" se refiere a los modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Cabe señalar que, tal y como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

- 5 10 A lo largo de esta memoria descriptiva y de los Ejemplos y reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender", y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.
- 15 Los siguientes ejemplos son representativos de las técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención.

EJEMPLOS

- 20 Sin más detalles, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes realizaciones específicas preferidas deben interpretarse, por lo tanto, como meramente ilustrativas y no limitativas de la invención reivindicada en modo alguno.
- 25 Los protocolos estándar de biología molecular que se conocen en la técnica y no se describen específicamente en el presente documento se siguen generalmente como en Sambrook & Russell, 2001.

Procedimientos experimentales

Biopsia

- 30 Las biopsias se obtuvieron de los pacientes mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por un médico experto.

Tinción BiP de tejidos obtenidos por biopsia

Soluciones y reactivos

- Xileno (Sigma #534056);
 - Etanol anhidro desnaturalizado, grado histológico (100% Solufix #E003 y 95% Sigma #32294);
 - 40 – Agua desionizada (dH₂O);
 - Hematoxilina Gill2 (Sigma #GHS216);
 - Tampón de lavado: 1X TBS/0,1 % Tween-20 (IX TBST): Para la preparación de 1 L, se añadieron 50 ml de TBS 20X (Amresco #J640) a 950 ml de dH₂O, se añadió 1 ml de Tween-20 (Amresco #J640) y se mezcló el tampón;
 - 45 – Diluyente de anticuerpos: Diluyente de anticuerpos SignalStain® #8112;
 - Desenmascaramiento del antígeno:
- o Citrato: Tampón de citrato de sodio 10 mM: Para la preparación de 1 L, se añadieron 2,94 gr de sal trisódica de citrato de sodio dihidratada (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O) a 1 L de dH₂O. El pH se ajustó a 6,0.
- 50 o TE: 10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 9,0: Para la preparación de 1L, se añadieron 1,21 gr de base Trizma® (C4H11NO3) y 0,372 g de EDTA a 1 L de dH₂O.

- Peróxido de hidrógeno al 3 %: Para la preparación de la solución de 100 ml, se añadieron 10 ml de H₂O₂ al 30 % (Sigma #216763) a 90 ml de dH₂O;
- Solución de bloqueo: Rompe fondos (Innovex #NB306);
- 55 – Anticuerpo primario: Anticuerpo anti BiP para Inmunohistoquímica (Anti-BIP ab21685, abcam);
- Anticuerpo secundario biotinilado: Reactivo de detección de inmunohistoquímica (IHC) SignalStain® Boost (HRP, conejo) #8114;
- Reactivo DAB (Sigma #D6190);
- Medio de montaje Eukitt (Sigma #03989);

Desparafinamiento/Rehidratación

- 60 Los portaobjetos no se dejaron secar en ningún momento durante este procedimiento. Las secciones de los tejidos de la biopsia se prepararon como se sabe en la técnica y se desparafinaron/hidrataron como sigue: las secciones se incubaron en tres lavados de xileno durante 5 minutos cada uno, se incubaron además en dos lavados de etanol al

100 % durante 10 minutos cada uno, se incubaron a continuación en dos lavados de etanol al 95 % durante 10 minutos cada uno y, por último, las secciones se lavaron dos veces en dH₂O durante 5 minutos cada uno.

Desenmascaramiento de antígenos

5 Para el citrato, los portaobjetos se hirvieron en un tampón de citrato de sodio 10 mM, pH 6,0, y se mantuvieron a una temperatura inferior a la de ebullición durante 10 minutos. Los portaobjetos se enfriaron en la mesa de trabajo durante 30 minutos. Para Tris EDTA (TE), los portaobjetos se hirvieron en 10 mM de TE/1 mM de EDTA, pH 9,0 y luego se mantuvieron a una temperatura inferior a la de ebullición durante 18 minutos. Los portaobjetos se enfriaron en el banco 10 durante 30 minutos.

Tinción

15 Las secciones se lavaron en dH₂O tres veces durante 5 minutos cada una, se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3 % durante 10 minutos, se lavaron en dH₂O dos veces durante 5 minutos cada una y se lavaron en tampón de lavado durante 5 minutos. A continuación, cada una de las secciones se bloqueó con 100-400 µl de solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 100-400 µl de anticuerpo primario (concretamente anti-BiP) diluido 1:500 en diluyente de anticuerpos a cada una de las secciones. Las secciones tratadas se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación, se eliminó la solución de anticuerpos y las secciones se lavaron en tampón de lavado tres veces durante 5 minutos cada una. Se añadió un anticuerpo secundario 20 biotinilado (100-400 µl) a cada una de las secciones y las secciones tratadas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en presencia del anticuerpo secundario. A continuación, se eliminó la solución de anticuerpos secundarios y las secciones se lavaron tres veces con tampón de lavado durante 5 minutos cada una. A continuación, se añadió el reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 100-400 µl) a cada una de las secciones y se monitorizó la tinción de cerca. 25 Tan pronto como las secciones se desarrollaron, los portaobjetos se sumergieron en dH₂O. Las secciones fueron contrateñidas opcionalmente con hematoxilina según las instrucciones del fabricante y luego lavadas en dH₂O dos veces durante 5 minutos cada una.

Deshidratación de secciones

30 Las secciones se incubaron en etanol al 95% dos veces durante 10 segundos cada una, la incubación se repitió en etanol al 100 %, incubando las secciones dos veces durante 10 segundos cada una. A continuación, se repitió la incubación en xileno, incubando las secciones dos veces durante 10 segundos cada una y luego se montaron los cubreobjetos para su análisis.

Preparación del péptido dTCapF y composición que comprende el mismo

40 El péptido dTCapF o NEROFE™ (ambos términos se utilizan en el presente documento indistintamente y se refieren al mismo péptido como se ha indicado anteriormente) es un péptido de 14 residuos de aminoácidos de longitud, en el que todos los residuos de aminoácidos están en su configuración D, que tiene la secuencia de aminoácidos de Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys (o WWTFFLPSTLWERK en un código de una sola letra, como se denota en la SEQ ID NO: 1).

45 El péptido se sintetizó de la siguiente manera. El acetato de dTCapF, el producto final del fármaco para su uso en los estudios clínicos fue fabricado, envasado, probado, etiquetado y liberado bajo Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) por Nextar Ltd., Israel.

50 El polvo de dTCapF para solución inyectable se suministró como un vial liofilizado de 5 ml que contenía 15 mg (a una concentración de 7,5 mg/ml) o un vial de 10mL que contenía 80 mg (a una concentración de 40 mg/ml) de la sustancia activa con 4,8 % de manitol, para su reconstitución a un volumen final de 2 ml con agua para inyección (WFI), por vial.

55 El vial reconstituido de 2 ml de dTCapF en polvo para solución inyectable debe diluirse posteriormente hasta un volumen final de 100 o 250 ml en Dextrosa acuosa al 5 % para infusión. Se suministró dTCapF por Nextar Ltd para el sitio clínico designado para su uso en un estudio clínico de fase uno.

60 El producto farmacéutico es una torta liofilizada blanca, no pirogénica, para una sola reconstitución en agua para inyección. Tras la reconstitución, tiene el aspecto de una solución clara e incolora. Los viales son de vidrio de inyección transparente de tipo I de 5ml o 10 ml, tapados con tapones de goma de tipo liofilización de 20mm, con un tapón abatible de aluminio de 20mm. Cada uno de los diez viales se presenta en una caja exterior blanca y etiquetada. El etiquetado de los viales y de la caja de envasado secundario del estudio clínico GCP se realiza bajo condiciones controladas por Nextar Ltd.

Esquema del ensayo clínico en curso

65 Pacientes

El estudio incluyó a pacientes adultos (≥ 18 años) con neoplasias malignas sólidas localmente avanzadas y/o metastásicas confirmadas patológicamente, que fracasaron o no pudieron tolerar la terapia estándar anterior. Los criterios clave de inclusión incluyeron la enfermedad evaluable/medible y el estado de rendimiento (PS) del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≤ 1 . Los pacientes con cáncer de hígado/metástasis hepáticas eran elegibles si la función hepática cumplía ciertos criterios, y los pacientes con metástasis cerebrales eran elegibles si la radioterapia se había completado ≥ 4 semanas antes de la inscripción y el paciente recibía ≤ 4 mg/día de dexametasona. Los criterios clave de exclusión incluyeron recibir un tratamiento anticanceroso 14 días antes del inicio del fármaco del estudio y una esperanza de vida de < 16 semanas. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 1.

10

Tabla 1. Datos demográficos y características de línea base de los pacientes

dosis de dTCApF					
	6 mg/m ² n=3	12 mg/m ² n=3	24 mg/m ² n=3	48 mg/m ² n=3	96 mg/m ² n=3
Edad, años					
Mediana (intervalo)	63 (62-77)	61 (58-62)	65 (57-67)	72 (51-94)	64 (55-77)
Media (SE)	68 (5)	67 (4)	67 (2)	72 (8)	64 (9)
Género, masculino/femenino, n/n	3/0	2-1	1-2	2-1	3-2
Tumor, tipo, n					
Colorrectal	3	2	0	2	1
Pancreático	0	0	1	0	4
Otros ^a	0	1	2	1	0
Terapias anteriores, n					
Quimioterapia	3	4	4	1	3
Radioterapia	1	2	1	1	0
Cirugía	2	2	1	1	2
Tratamiento con agentes biológicos	0	0	1	0	0
Tratamiento con pequeñas moléculas tal como los inhibidores de la tirosina quinasa	0	0	0	1	0

^aIncluye neoplasias en el intestino delgado, el pulmón, el hígado y la médula espinal.

Diseño del estudio

El presente estudio clínico es un estudio formal abierto de fase I de escalada de dosis. El objetivo principal era determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y el perfil de seguridad de los dTCApF. Las evaluaciones incluyeron la exposición al fármaco, los acontecimientos adversos (EA; calificados de acuerdo con los Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)) y la caracterización de las toxicidades limitantes de la dosis (DLT). Otros objetivos fueron la evaluación de los niveles séricos de factores angiogénicos tras la administración de dTCApF, los análisis de farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD), así como la evaluación de la tinción de los receptores y la respuesta tumoral.

El estudio de escalada de dosis siguió un esquema tradicional "3+3" e incluyó dosis de 6, 12, 24, 48 y 96 mg/m² intravenosas (i.v.) de dTCApF, 3 veces/semana en ciclos consecutivos de 28 días. Las asignaciones de los pacientes se presentan en la Figura 1. En todas las cohortes de 3 pacientes, hubo 2-4 semanas entre la primera dosis para el primer y segundo paciente, y ≥ 1 semana para el tercer paciente. Los nuevos niveles de dosis se iniciaron tras un seguimiento de ≥ 28 días para 3 pacientes en el nivel anterior. La MTD se definió como el nivel de dosis más alto en el que ≥ 1 de 3 sujetos experimentan una DLT durante su primer ciclo de tratamiento. Los pacientes que no completaron su primer ciclo de tratamiento por razones no relacionadas con los EA fueron reemplazados. Además, se determinaron los parámetros PK, incluyendo el área bajo la curva (AUC), la concentración plasmática máxima (Cmáx) y la vida media plasmática (t1/2). Los parámetros PK se estimaron mediante modelos no compartimentales.

En otras palabras, los pacientes fueron administrados i.v. con dTCApF a 6 mg/m², 3 veces por semana, mientras su enfermedad no progresara. Si se comprobaba que una dosis de 12 mg/m² era segura y la enfermedad progresaba, se administraba al paciente con 12 mg/m². Por ejemplo, al paciente número 1 de la Figura 1 se le administraron dos ciclos

de tratamiento (a 6 y 12 mg/m² de dTCapF). El paciente número 4 de la Figura 1 recibió tres ciclos de tratamiento (a 12, 24 y 48 mg/m² de dTCapF).

5 La actividad clínica de los dTCapF se evaluó cada 8 semanas por medio de un examen físico, una tomografía computarizada (TC) o técnicas de resonancia magnética (RMN) (sólo para la enfermedad evaluable), utilizando RECIST v1.1; y, en su caso, marcadores tumorales informativos cada ciclo. Este estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional del Rabin Medical Center y el Ministerio de Salud de Israel y se llevó a cabo en el Davidoff Center, Rabin Medical Center de acuerdo con la Declaration of Helsinki. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de la inscripción. El estudio se registró en ClinicalTrials.gov (NCT01690741).

10 Administración

15 El polvo para solución inyectable dTCapF se suministra como un vial liofilizado de 5ml que contiene 15 mg (7,5 mg/ml) o un vial de 10ml que contiene 80 mg (40 mg/ml) de la sustancia activa con 4,8 % de manitol, para su reconstitución hasta un volumen final de 2 ml con agua para inyección por vial como se ha descrito anteriormente. El vial reconstituido de 2 ml de dTCapF en polvo para solución inyectable debe diluirse posteriormente hasta un volumen final de 100 ml en Dextrosa acuosa al 5 % para infusión para niveles de dosis de hasta 48 mg/m². Para niveles de dosis superiores a 48 mg/m², el volumen de dilución final fue de 250 ml. El dTCapF para inyección se administró por vía intravenosa (iv) durante 60 minutos.

20 Análisis farmacocinéticos

25 Los parámetros PK, incluyendo AUC(0-24), Cmáx, Cmín, Tmáx y t_{1/2} se estiman utilizando modelos no compartimentales. Se realizan comparaciones entre niveles de dosis para evaluar la proporcionalidad. En la Tabla 2 se presenta un resumen de los parámetros de PK.

Tabla 2. Farmacocinética de los dTCapF el primer día de los ciclos 1 y 2 (cada ciclo fue de 28 días).

dosis de dTCapF	Ciclo 1, Día 1					Ciclo 2, Día 1				
	6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²	6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
n = 3	n = 3	n = 4	n = 4	n = 4	n = 3	n = 3	n = 4	n = 4	n = 4	n = 3
AUC ₀₋₂₄ , ng·h/ml	3813	12.905	49.630	79.935	206.742	9719	11.452	57.069	100.093	294.682
Cmáx, ng/ml	1209	6048	14.609	18.267	32.964	1536	6048	14.609	22.113	32.016
T _{1/2} , h	2,3	2,1	3,2	4,9	6,0	2,8	2,0	3,7	4,6	8,5

30 Análisis farmacodinámicos

35 Los cambios desde la línea base en los niveles de citoquinas circulantes y del receptor T1/ST2 soluble y la expresión del receptor T1/ST2 de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se presentan para su interpretación y se correlacionan con los análisis de PK y de actividad antitumoral. Si se obtienen muestras de tejido tumoral antes del tratamiento y/o durante el tratamiento, los resultados de los ensayos de los receptores T1/ST2 se presentan para su interpretación clínica.

40 Análisis de biomarcadores

45 Se tomaron muestras de sangre de los pacientes y se colocaron en hielo durante 10 minutos de forma regular, como se describe a continuación. El suero se recogió centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se guardó en un vial separado a ≤ -20 °C, y se envió a Immune System Key Ltd a -20°C, donde se descongelaron, se tomaron alícuotas y se almacenaron a ≤ -20 °C. Se evitaron los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

50 Se realizó una tinción inmunohistoquímica (IHC) para el receptor T1/ST2 utilizando un anticuerpo anti-ST2 de longitud completa (GenMed, Plymouth, MN). Los niveles séricos de diversos factores se midieron con un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Otros factores que se midieron incluyeron: Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D), factor de crecimiento epidérmico (EGF), angiopoyetina-1, factor 1 de crecimiento de fibroblastos (FGF-1), factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), factor de crecimiento derivado de las plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1) (todos ellos mediante kits ELISA de R&D systems, Abingdon, Reino Unido); factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 2 (IL-2), interleucina 12p70 (IL-12p70), interleucina 21 (IL-21) y factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (Millipore, Billerica, MA); y proteína regulada

por glucosa 78 (GRP78)/BiP (Enzo, Nueva York, NY). En la Tabla 3 se presenta un resumen de los niveles séricos de diversos factores angiogénicos y citoquinas medidos en pacientes sometidos a tratamiento con el péptido.

Tabla 3. Cambio medio en los niveles séricos de factores angiogénicos y citoquinas con la administración de dTCapF

dosis de dTCapF	6 mg/m ² n = 3	12 Mg/m ² n = 3	24 Mg/m ² n = 3	48 Mg/m ² n = 3	96 Mg/m ² n = 5
Cambio en el nivel sérico de antes a después del tratamiento con dTCapF, %					
Factores angiogénicos					
Angioeitina-1	960	-80	-77	-50	70
FGF-1	120	-62	-20	-27	457
FGF-2	199	-74	-34	-13	44
PDGF-AA	1379	-92	-79	-73	57
PDGF-BB	2271	-95	-82	-78	185
VEGF-A	265	-47	-62	-72	-2
TGF-β1	18	-80	-59	-20	No hay datos
VEGF-D	117	-40	-54	-63	3
Citoquinas					
GM-CSF	2173	-97	11	5613	974
IL12-p70	469	-76	83	477	332
II-2	No hay datos	-100	No hay datos	242	577
II-21	100	-61	84	1326	29
TNF-α	4	-5	31	74	97

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL: interleucina; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; TGF: factor de crecimiento transformante; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; TNF: factor de necrosis tumoral.

Inmunogenicidad

Los cambios desde la línea base en los niveles de anticuerpos circulantes anti- dTCapF se presentan para su interpretación.

Ánalisis de la actividad antitumoral

Los sujetos con enfermedad evaluable o medible se evalúan de acuerdo con los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST) versión 1.1 cada 2 ciclos, donde un ciclo se define como 4 semanas de tratamiento con tres administraciones por semana. Las mediciones de las lesiones tumorales y los cambios con respecto a la línea de base se resumen por ciclo y cohorte de dosis. En la Tabla 4 se presenta un resumen de los efectos adversos por grupo de dosis de dTCapF.

Tabla 4. Resumen de eventos adversos por grupo de dosis de dTCapF

	dosis de dTCapF				
	6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 5
Grado 1					
Trastornos sanguíneos					
Anemia	3	0	0	0	0

(continuación)

		dosis de dTCApF				
		6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
		n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 5
Aumento del INR		0	0	0	1	0
<i>Trastornos gastrointestinales</i>						
Dolor abdominal		0	1	2	0	0
Obstrucción intestinal		1	0	0	0	0
Diarrea		0	2	0	0	2
Hemorragia gastrointestinal		1	0	0	0	0
Vómitos		2	0	0	0	1
<i>Trastornos del género</i>						
Deshidratación		0	0	0	0	1
Fatiga		0	1	0	1	0
Hipertensión		3	1	1	0	1
<i>Trastornos del sistema nervioso</i>						
Neuropatía		0	1	1	0	0
Grado 2						
<i>Dolor</i>						
<u>Dolor, pierna</u>		0	2	0	0	0
<u>Dolor en la parte superior de la espalda</u>		0	0	0	0	1
<i>Trastornos del sistema respiratorio</i>						
<u>Tos</u>		0	1	0	0	0
<i>Trastornos de la piel</i>						
<u>Prurito</u>		0	0	0	0	1
<u>Urticaria</u>		0	0	0	0	1
<i>Trastornos hepáticos y urinarios</i>						
<u>Aumento de ALT</u>		0	0	0	0	1
<u>Aumento de AST</u>		0	0	0	0	1
<u>Aumento de la bilirrubina</u>		0	0	0	1	1
<u>Disfunción hepática</u>		0	0	0	0	1

(continuación)

		dosis de dTCapF				
		6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 5	
<u>Infección de las vías urinarias</u>	0	1	0	0	0	
Grado 3						
<i>Trastornos sanguíneos</i>						
Aumento del INR	0	0	0	1	0	
<i>Trastornos generales</i>						
Hipertensión	2	1	1	0	2	
<i>Trastornos hepáticos y urinarios</i>						
Aumento de la bilirrubina	0	0	0	1	1	
<i>Trastornos gastrointestinales</i>						
Obstrucción intestinal	1	0	0	0	0	
Diarrea	0	1	0	0	1	
Hemorragia gastrointestinal	1	0	0	0	0	
Grado 4						
<i>Trastornos gastrointestinales</i>						
Vómitos	0	0	0	0	1	

ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GI, gastrointestinal; INR, ratio internacional normalizado.

5 Se presentan las tasas de respuesta tumoral objetiva (respuesta completa y respuesta parcial), la duración de la respuesta tumoral objetiva, el tiempo hasta la respuesta tumoral objetiva y la supervivencia sin progresión. Las estimaciones de tiempo hasta el acontecimiento y las curvas de supervivencia se generan mediante el procedimiento de Kaplan-Meier y el modelo de Cox con la razón de riesgo cruda calculada y la razón de riesgo ajustada (ajustada por las variables de confusión). Los sujetos con evaluaciones informativas de marcadores tumorales (por ejemplo, CA125 o PSA) se someten a evaluaciones adecuadas en cada ciclo. Los parámetros de los marcadores tumorales, 10 cuando son evaluables, se resumen por ciclo y cohorte de dosis. Se realiza una evaluación exploratoria de la relación entre PK, PD y efectos clínicos de los dTCapF. En la Tabla 5 se presenta un resumen de la supervivencia libre de progresión (PFS) de los pacientes incluidos en el estudio.

15 **Tabla 5.** La PFS en el último régimen antes de inscribirse en el estudio y en los dTCapF. Las filas en gris representan a los pacientes que experimentaron una PFS con dTCapF comparable o superior a la de su último régimen antes de la inscripción.

Paciente no.	PFS con el último régimen antes de la inscripción, días	SFP en dTCapF, días
1	480	53
2	134	25
3	110	170
4	0	330
5	52	51

(continuación)

Paciente no.	PFS con el último régimen antes de la inscripción, días	SFP en dTCapF, días
11	41	52
12	42	50
13	96	42
14	365	40
15	1	80
16	105	45
17	564	41
SLP, supervivencia libre de progresión		

5 Análisis estadístico

Se utilizaron estadísticas descriptivas para todos los análisis y se realizaron con SAS® versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Se utilizó un análisis de regresión para estudiar la correlación bidireccional entre el cambio del tumor por mes, las dosis administradas de dTCapF y los niveles del biomarcador de tensión del RE (BiP). La significancia estadística de la correlación se validó mediante el estadístico F.

10 Determinación del nivel de sangre del marcador GRP78/Bip mediante ELISA

15 La determinación del nivel plasmático de BiP en los pacientes sometidos al tratamiento con el péptido dTCapF se realizó como sigue.

20 Recolección de muestras

25 Se recogió la sangre de los pacientes tratados con dTCapF en tubos Vacutainer con tapa de lavanda, y se colocó en hielo durante 10 minutos. A continuación, el Vacutainer se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La fracción de plasma se recogió en un vial separado y se conservó a ≤ -20 °C hasta que se envió al departamento de I+D con World Courier a -20 °C. Cuando se recibieron, las muestras de suero se descongelaron, se hicieron alícuotas de 56 µl en viales de 0,5 ml y se almacenaron a ≤ -20 °C. Se evitaron los ciclos repetidos de congelación y descongelación. Se recogió sangre los días 1, 15 y 29 del primer ciclo y el día 29 de los ciclos siguientes.

30 Determinación de los niveles sanguíneos de GRP78/BIP

35 La determinación de los niveles sanguíneos de GRP78/BIP se realizó utilizando el kit GRP/BIP ELISA (cat# ADI-900-214 Enzo). Las alícuotas de las muestras de plasma se descongelaron a 4 °C y se centrifugaron a 10.000G durante 6 minutos a 4 °C. A continuación, las muestras se diluyeron 1:5 con tampón salino Tris con BSA y detergentes (kit de ensayo). A continuación, las muestras se cargaron por duplicado en la placa de 96 pocillos suministrada, que se recubrió previamente con IgG antioveja de burro. También se cargaron en la placa las muestras de calibración y las muestras en blanco, y a continuación se añadió el anticuerpo dirigido a BiP (amarillo) en todos los pocillos, excepto en los en blanco. La placa ELISA se selló y se incubó a temperatura ambiente (TA) con agitación a 750 vueltas por minuto (RPM) durante 1 hora.

40 Tras el periodo de incubación anterior, la placa no se lavó y se añadió el conjugado BiP (azul) a todos los pocillos, excepto a los en blanco. La placa se incubó con agitación durante 1 hora más (TA).

45 Tras el periodo de incubación adicional, se aspiró el contenido de los pocillos y se lavaron los pocillos mediante un lavado automatizado (estación de lavado Bio-plex pro II) añadiendo 300 µl de solución salina tamponada con Tris que contiene detergentes (el tampón de lavado del kit) a cada pocillo. El procedimiento de lavado se repitió tres veces más para un total de cuatro lavados. Tras el último lavado, se aspiraron los pocillos y se golpeó la placa firmemente boca abajo sobre una toalla de papel sin pelusa para eliminar cualquier residuo de tampón de lavado.

50 Se añadió una solución de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en cada pocillo, y se selló la placa y se incubó durante 19 minutos a TA en la oscuridad con agitación. A continuación, se añadió la solución de parada en cada pocillo y se leyó la DO delta a 450 nm/570 nm. Los valores de los pocillos en blanco se restaron de todos los resultados. Se creó la curva de calibración y los valores de BiP ng/ml se calcularon en consecuencia y se multiplicaron por el factor de dilución (x5).

Cálculo de la diferencia en el nivel de expresión de BiP en plasma

La diferencia en el nivel de expresión plasmática de BiP se determinó calculando la diferencia entre el nivel de expresión de BiP medido en el plasma de un paciente tratado con dTCAPF en el día 29 de tratamiento y el nivel de expresión de BiP medido en el plasma de un paciente tratado con dTCAPF en el día 1 de tratamiento (antes de la primera administración del péptido dTCAPF) y dividiendo el resultado por el nivel de expresión de BiP anterior medido en el día 1 de tratamiento (normalizando), es decir como sigue: [(nivel de BiP en el día 29) - (nivel de BiP en el día 1)]*100/ (nivel de BiP en el día 1).

10 Determinación del nivel de Calreticulina (CRT) en sangre

Los niveles de CRT en suero se determinaron utilizando el kit Elisa CRT (humano) (OKEH01054, Aviva system Biology). Las muestras de los pacientes de los días 1 y 15 o 29 del ciclo 1 (C1D1, C1D15 y C1D29) fueron descongeladas y centrifugadas a 10 minutos a 10.000G y cargadas en la placa de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Determinación del tamaño del tumor

El tamaño del tumor se evaluó en el centro médico de acuerdo con las directrices del Criterio de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (por ejemplo, realizando una tomografía computarizada (TC)). El tamaño del tumor en el último día del ensayo (es decir, después de la última administración del péptido) se comparó con el tamaño del tumor en el primer día del ensayo (antes de la primera administración del péptido), en porcentaje.

Evaluación del estado de ST2 en las células cancerosas

El estado de ST2 en las células cancerosas se evaluó en muestras de biopsia obtenidas de pacientes mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo específico contra el receptor st2 humano. Tras el paso de tinción, la biopsia fue evaluada por un patólogo.

30 Inmunocitoquímica (ICC) de las células OV90 tratadas con dTCAPFMateriales para el crecimiento y el tratamiento de los cultivos celulares

Medios de cultivo:

- 35 – DMEM alto en glucosa, L-Glutamina (Gibco 41965-039);
- Piruvato sódico 11,0mg/ml (100mM) (Biological industries cat No. 03-042-1B);
- 50 ml de FBS (Biological industries cat no. 04-121-1A);
- 0,5 ml de Anfotericina B 2500µg/ml (Biological industries cat no. 03-029-1);
- 5 ml de sulfato de gentamicina 50mg/ml (Biological industries cat no. 03-035-1);

40 Medios de tratamiento:

El medio de tratamiento se basó en el medio de cultivo complementado con 5 % de manitol (Sigma cat no. M4125-500G). El medio se filtró en un filtro de 0,2 µm después de añadir el manitol.

Materiales adicionales:

- 45 – Tripsina EDTA (Biological industries cat no. 03-052-1B);
- Frascos de cultivo de 75cm² (Nunc cat no. 178905);
- Frascos de cultivo de 25cm² (Nunc cat no. 136196);
- 20 mg/ml de dTCAPF en manitol (utilizar alícuotas, evitar el ciclo repetido de congelación-descongelación);
- se utilizaron líneas celulares de cáncer de ovario humano OV90: OV90 normal (colección de cultivos de tipo americano, ATCC) y T1/ST2 KO OV90 (fabricado por los inventores);

50 Materiales para ICC:

- Portaobjetos: Sistema de portaobjetos de cámara Nunc™ Lab-Tek™ II (154534 Nunc);
- Tampón de lavado: PBS (02-023-5A Industrias Biológicas);
- Solución de fijación: Formaldehído al 3% (252549 Sigma) en PBS;
- Solución de permeabilización: 0,25% de Triton X-100 (0694 Amresco) en PBS;
- Tampón de bloqueo: 1 % BSA (A7906 Sigma), 22,52 mg/ml de glicina (G8898-500G Sigma) en PBS con 0,1 % de Tween-20 (0777 Amresco);
- Tampón de anticuerpos: 1 % BSA (A7906 Sigma) en PBS con 0,1 % Tween-20 (0777 Amresco);

- Anticuerpos primarios: anti-58k marcador de Golgi (ab27043) diluido 1:500, anti- β -COP (ab6323) diluido 1:250, anti-GRP78 BiP (ab21685) diluido 1:1.000 (los anticuerpos se adquirieron en Abcam);
- Anticuerpo secundario: Para el marcador de Golgi 58k y β -COP: ZyroChem Plus (HRP) Polímero anti-conejo (ZUC032-006). Para BiP: ZyroChem Plus (HRP) Polímero anti-ratón (ZUC050-006);
- 5 - DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina, D3939 Sigma);
- Medio de montaje acuoso (ab 128982 Abcam).

Crecimiento del cultivo celular

10 Las células OV90 y OV90 ST2 KO se cultivaron en frascos en una incubadora a 37 °C, 5 % deCO₂ y 100 % de humedad hasta alcanzar una densidad del 70-80 %. El medio se vació de los frascos con una pipeta. A continuación, se añadieron 4 ml de tripsina EDTA a cada frasco y se colocaron los frascos en la incubadora durante unos minutos hasta que la mayoría de las células se desprendieron de los frascos. Se evitó golpear los matraces para aumentar el desprendimiento de las células. A continuación, se añadió medio (10 ml) a los matraces y los cultivos en medio y tripsina se dividieron en 2 matraces, a cada uno de los cuales se añadieron 15 ml de medio fresco. Las células se incubaron 2-3 días para que crecieran hasta alcanzar 70-80 % y se repitió el procedimiento de paso según fuera necesario.

Tratamiento celular

20 Los cultivos celulares crecidos como se ha detallado anteriormente en medio y tripsina se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml y los tubos se centrifugaron a 300 g durante 10min a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante y se añadieron 15 ml de medio fresco a la pella de células, para fluidificar la pella. Se contaron las células y se sembraron a 10.000 células/pocillo en un portaobjetos de cámara en 1 ml de medio de cultivo. Los portaobjetos de la cámara se colocaron en reposo en la campana durante 1 hora y luego se transfirieron a la incubadora, durante toda la noche. Al día siguiente se preparó el medio de tratamiento celular con 50 μ g/ml de dTCapF. Las células se trataron aspirando y desecharando el medio de los portaobjetos y añadiendo 0,5 ml de medio de tratamiento celular con dTCapF (o control) a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas en la incubadora. Después de este periodo, se añadió una dosis adicional de medio de tratamiento que contenía dTCapF a los pocillos de células tratadas y se recogieron las células después de otras 30 24 horas de incubación.

Inmunocitoquímica

35 Las células tratadas como se ha detallado anteriormente se sometieron al siguiente protocolo ICC. Una vez completado el periodo de incubación, se aspiró el medio y se lavaron las células llenando cada pocillo con tampón de lavado. A continuación, se descartó el tampón y se añadieron 300 μ l de solución de fijación a cada pocillo. Las células se incubaron a TA durante 15 minutos. A continuación, se desecharó la solución de fijación y los pocillos se enjuagaron brevemente dos veces. A continuación, se añadieron 300 μ l de solución de permeabilización a cada pocillo y se incubaron las células a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se descartó la solución de permeabilización y se lavaron los pocillos 3 veces, 5 minutos por cada lavado. Se añadió tampón de bloqueo (1 ml) a cada pocillo y las células se incubaron a TA durante 1 hora. Antes de finalizar el tiempo de incubación, los anticuerpos primarios detallados anteriormente se diluyeron en tampón de dilución de anticuerpos. A continuación, se descartó el tampón de bloqueo de los pocillos y se añadieron 120 μ l de anticuerpo primario a cada pocillo. A continuación, se cubrieron las células con Parafilm (o cinta adhesiva) y se incubaron durante la noche a 4 °C.

45 45 Al día siguiente, se descartó el anticuerpo primario y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado, 5 minutos por cada lavado. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario a cada pocillo (1-2 gotas) y se incubaron los pocillos de células a TA durante 30 minutos. A continuación, se lavaron los pocillos 3 veces con tampón de lavado, 5 minutos por cada lavado. El sustrato DAB (recién preparado y filtrado en un filtro de 0,2 μ m) se añadió a cada pocillo (1-2 gotas) y los pocillos de células se incubaron de 5 a 15 minutos mientras se comprobaba el desarrollo. Los pocillos de células se lavaron con PBS durante 5 minutos. A continuación, se retiraron los pocillos del portaobjetos y se secó el portaobjetos al aire. Se añadió medio de montaje y se colocó el portaobjetos en un cubreobjetos. La visualización se realizó con un microscopio de luz.

55 Ensayo de incorporación de BrdU en presencia de Taxol o dTCapF

Se trataron células de cáncer de páncreas humano (BxPC3) y células de cáncer de ovario humano (OV90) con dTCapF o Taxol durante 24 horas en presencia de BrdU, como se detalla a continuación.

60 60 Las células se colocaron a 2.000 células/pocillo en el centro de una placa de 96 pocillos con 100 μ l de DMEM (life science 41965-039) y 10 % de suero fetal de ternera (FBS, Biological industries 14-127-1A) durante 24 horas en una incubadora a 37°C con 5 % de CO₂. A continuación, se sustituyó el medio por 200 μ l de DMEM con 2,5 % de FBS y Taxol (sigma T7402) a una concentración final de 2 nM o 4 nM en DMSO o dTCapF (nextar ISK353-01 lote 351-01/1,68) a una concentración final de 25 μ g/ml en DMSO. El medio de las células de control se sustituyó por DMEM y

FBS, como se ha indicado anteriormente. La concentración máxima de DMSO en los pocillos de células fue inferior al 0,5 %. Se utilizaron cuatro pocillos para cada concentración.

5 Las células tratadas con Taxol y dTCAPF, así como las células de control, se incubaron además durante 24 horas en presencia de BrdU de la siguiente manera: Se añadieron 20 µl de reactivo BrdU (diluido 1:100 en DMEM suplementado con 2,5 % de FBS) a las células y la placa se incubó 24 horas en una incubadora a 37° con 5 % de CO₂. El ELISA de BrdU se realizó de acuerdo con el protocolo del kit (Millipore #2752).

Ensayo de incorporación de BrdU en presencia de Taxol y dTCAPF

10 Se trataron células de cáncer de páncreas humano (BxPC3) y células de cáncer de ovario humano (OV90) con dTCAPF y Taxol durante 24 horas en presencia de BrdU, como se detalla a continuación.

15 Las células se colocaron a 2000 células/pocillo en el centro de una placa de 96 pocillos con 100 µl de DMEM y 10 % de FBS durante 24 horas en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂. A continuación, se sustituyó el medio por 200 µl de DMEM con 2,5 % de FBS y dTCAPF a una concentración final de 25 µg/ml (nextar ISK353-01 lote 351-01/1,68) en DMSO. La concentración máxima de DMSO en los pocillos de células fue inferior al 0,5 %. Se utilizaron cuatro pocillos para cada concentración. A continuación, se añadió Taxol a una concentración final de 2 nM o 4 nM (en 5 µl de DMEM suplementado con 2,5 % de FBS) a las células que contenían dTCAPF y las células tratadas se incubaron además durante 24 horas en presencia de BrdU como se indica a continuación: Se añadieron 20 µl de reactivo BrdU diluido 1:100 en DMEM suplementado con 2,5 % de FBS a las células 24 horas antes del final del experimento. Por último, se realizó el ELISA de BrdU de acuerdo con el protocolo del kit (Millipore #2752).

Ejemplo 1

El péptido dTCAPF aumenta la tensión del retículo endoplásmico (RE) en las células cancerosas

Como se ha indicado anteriormente, se identificó un péptido denominado "T101" que está codificado por un ADNc exclusivo del timo humano y se informó que, *entre otras cosas*, reduce el tamaño del tumor canceroso. Además, se ha informado de que un derivado peptídico de T101, denominado en el presente documento dTCAPF (o "Nerofe"), disminuye la secreción de proteínas que se sabe que están asociadas a la metástasis del cáncer por parte de las células cancerosas e inhibe directamente la migración de las células cancerosas *in vitro* (16).

Como se ha descrito anteriormente, actualmente se está realizando un ensayo clínico con el péptido dTCAPF. Este péptido tiene la secuencia de aminoácidos todo D de Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys, como se denota en la SEQ ID NO: 1 y se preparó como se ha descrito anteriormente.

El péptido dTCAPF se administró a pacientes con cáncer como se ha descrito anteriormente (Tabla 1) en el régimen de dosificación indicado, por vía intravenosa (iv), 3 veces por semana.

40 Para investigar el efecto del péptido dTCAPF en las células cancerosas, se tomaron biopsias de un paciente con tumor en la médula espinal tratado durante 11 meses con dTCAPF bajo el régimen descrito anteriormente. Se obtuvieron biopsias de tejido del paciente antes del tratamiento y después de 11 meses de tratamiento y se tiñeron con un anticuerpo anti-BiP para detectar el nivel de BiP, un marcador de tensión del retículo endoplásmico (RE).

45 Como se ha detallado anteriormente, la proteína inmunoglobulina de unión (BiP), también conocida como GRP78, actúa como una chaperona molecular en el RE y su síntesis está marcadamente inducida bajo condiciones que conducen a la acumulación de polipéptidos desplegados en el RE.

50 Como se muestra en la Figura 2, se observó una clara diferencia en el nivel de BiP en una biopsia obtenida del paciente antes de iniciar el tratamiento (Figura 2A) y después de 11 meses de tratamiento (Figura 2B), lo que demuestra que el péptido dTCAPF aumentó la tensión del RE en los tumores obtenidos de un paciente con cáncer de la médula espinal.

Ejemplo 2

Un aumento en el nivel del marcador ER BiP se correlaciona con una reducción del tamaño del tumor

Como se detalla en el Ejemplo 1 anterior, se demostró que el péptido dTCAPF aumenta la tensión del RE en las células tumorales obtenidas de pacientes sometidos a terapia con este péptido, con base en el aumento observado del nivel de BiP. Sorprendentemente, el aumento de la BiP del marcador de tensión del RE se encontró en una alta correlación con una inhibición del crecimiento del tumor en los pacientes tratados, como se detalla a continuación.

65 Se determinó el nivel de BiP en el plasma de los pacientes con cáncer que participaban en el estudio clínico con el péptido dTCAPF realizado como se ha detallado anteriormente el día 1 (antes de la primera administración de dTCAPF) y el día 29 de tratamiento con dTCAPF. El nivel plasmático de BiP obtenido para un paciente con cáncer el día 1 del

tratamiento (el nivel "de referencia") se restó entonces del nivel plasmático de BiP obtenido para el mismo paciente con cáncer el día 29 del tratamiento.

Paralelamente, se evaluó el tamaño del tumor de los pacientes con cáncer participantes mediante una tomografía computarizada (TC), como se ha descrito anteriormente, el día 1 (o justo antes de iniciar el tratamiento) y el último día de tratamiento. A continuación, se calculó la diferencia de tamaño del tumor (también denominada en el presente documento "cambio tumoral") como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el "cambio tumoral" es una medida de la diferencia en el tamaño del tumor obtenida tras el tratamiento con dTCAPF entre el primer día de tratamiento (día 1) y el último día de tratamiento (la duración del tratamiento se determinó con base en criterios como los mencionados anteriormente).

En total, se seleccionaron 39 pacientes, de los cuales 17 se inscribieron y completaron el estudio. La mayoría de los pacientes (64 %) eran varones, y la edad media (intervalo) era de 65 (51-94) años. Casi la mitad de los pacientes (47 %) tenía cáncer colorrectal (CCR) y aproximadamente una cuarta parte (29 %) tenía cáncer de páncreas. Todos los pacientes, excepto uno, recibieron varias líneas de tratamiento anticáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica) antes de inscribirse (Tabla 1). Los pacientes recibieron de 1 a 3 ciclos de dosis escaladas de dTCAPF (6 mg/m², 12 mg/m², 24 mg/m², 48 mg/m², y 96 mg/m²), como se detalla en la Figura 1.

Como se indicó anteriormente, los niveles séricos de la proteína GRP78/BiP (como biomarcador de tensión del RE) se midieron antes de iniciar el tratamiento con dTCAPF y después de 29 días de tratamiento, como se indicó anteriormente. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las dosis administradas de dTCAPF y el cambio en los niveles séricos de GRP78/BiP ($P \leq 0,05$), como se demuestra en la Figura 3, así como entre los cambios en el tamaño del tumor y los cambios en los niveles séricos de GRP78/BiP ($P \leq 0,002$) (Figura 4), lo que sugiere que los dTCAPF indujeron tensión de RE.

Como se muestra en la Figura 4, hubo una correlación lineal (negativa) entre el cambio en el nivel de BiP y el cambio en el tamaño del tumor, es decir, un aumento en el nivel de BiP se correlacionó con la inhibición completa del crecimiento del tumor. Estos resultados demuestran que el dTCAPF actúa, *entre otras cosas*, incrementando la tensión del RE en las células cancerosas y, sin querer ser ajeno a la teoría, a través de la alteración del complejo de Golgi, lo que conduce a la muerte de las células cancerosas.

Los niveles séricos de BiP en los pacientes que participaron en el ensayo clínico, determinados en los días 1 y 29 del tratamiento descrito anteriormente, se presentan en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Niveles séricos de BiP en los pacientes participantes en el ensayo clínico

Paciente	Cohorte	Ciclo	Día	ng/ml BiP	DevEst. (log)
002	1	1	1	21,30	0,06
002	1	1	29	26,94	2,74
006	2	1	1	9,85	6,75
006	2	1	29	38,91	3,00
007	2	1	1	51,03	2,77
007	2	1	29	38,68	0,64
011	2	1	1	45,78	1,01
011	2	1	29	23,89	0,44
012	3	1	1	13,81	0,55
012	3	1	29	21,17	0,23
013	3	1	1	48,33	0,31
013	3	1	29	26,94	3,55
015	3	1	1	56,53	2,25
015	3	1	29	46,62	1,16
017	4	1	1	86,18	0,24
017	4	1	29	27,94	0,15
022	5	1	1	22,90	0,15
022	5	1	29	48,62	1,25
023	5	1	1	20,67	0,65
023	5	1	29	39,86	0,11

(continuación)

Paciente	Cohorte	Ciclo	Día	ng/ml BiP	DevEst. (log)
035	5	1	1	38,44	0,46
035	5	1	29	169,21	0,47

- 5 Curiosamente, como se indica en la Tabla 3 anterior, el tratamiento con dTCAPF a una dosis de 6 mg/m² condujo a un aumento de los niveles séricos de angiopoyetina-1, FGF-1, FGF-2, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF-D, TGF-β y VEGF. Sin embargo, a dosis de 12-48 mg/m², se observó una disminución de los niveles séricos de estos factores, y a 96 mg/m², se observó un aumento de todos los factores excepto del VEGF-D. Además, los niveles séricos de todas las citocinas anticancerígenas, tales como GM-CSF, IL2, IL-12p70, IL-21 y TNF-α, aumentaron con la administración de dTCAPF en todos los niveles de dosis.
- 10 10 Para explorar el modo de actividad (MOA) de los dTCAPF, los pacientes fueron examinados por su estado T1/ST2. Se observó que los pacientes cuyos tumores eran positivos a T1/ST2 (como se determinó por IHC) permanecieron en el ensayo más tiempo que aquellos cuyos tumores eran negativos a T1/ST2, como se demuestra en la Figura 5, y experimentaron una enfermedad estable (SD) durante el tratamiento con dTCAPF.
- 15 15 El receptor T1/ST2 (también referido en el presente documento como "ST2" y "ST2/T1") es un miembro de la superfamilia de receptores de interleucina 1 (IL-1R). Como se sabe en la técnica, los miembros de la superfamilia de receptores de interleucina-1 (IL-1R) se caracterizan por tener dominios extracelulares similares a la inmunoglobulina y un dominio intracelular Toll/Interleucina-1R (TIR). Los miembros de esta familia desempeñan un importante papel 20 en la defensa del huésped, las lesiones y la tensión. Se ha informado previamente de que el péptido T101 del timo, del que se derivó el péptido dTCAPF, puede servir como ligando del receptor T1/ST2 (13-15).
- 25 25 Por lo tanto, se volvieron a analizar los niveles de BiP (es decir, los cambios en el tamaño del tumor frente a la dosis de dTCAPF administrada) para cada una de las poblaciones (pacientes positivos a T1/ST2 y pacientes positivos a T1/ST2). Los resultados se presentan gráficamente en la Figura 6.
- 30 30 Como se muestra en la Figura 6, en la que se separaron los cánceres positivos a ST2 y negativos a ST2, la correlación del nivel del marcador BiP con el cambio del tumor en las células cancerosas que eran positivas a ST2 dio como resultado un valor R de -0,98 y en las células cancerosas que eran negativas a ST2 dio como resultado un valor R de -0,83. El valor p del gráfico positivo del ST2 no es óptimo debido al pequeño conjunto de datos.
- 35 35 Sin querer estar limitado por la teoría, esta diferencia indica que la mayor abundancia del receptor ST2 en las células positivas a ST2 facilita la entrada del péptido dTCAPF en estas células, por lo que presumiblemente se requieren dosis más bajas del péptido.
- 40 40 Cabe destacar que incluso en las células definidas como "negativas a ST2" existe un amplio receptor ST2 para incorporar el péptido dTCAPF en las células, aunque en menor abundancia que en el caso de las células positivas a ST2.
- 45 45 Los resultados presentados anteriormente indican que la BiP del marcador de tensión del RE puede ser utilizada como un marcador de la eficiencia del péptido dTCAPF en la inhibición del crecimiento del tumor en pacientes con cáncer tratados con este péptido. Dado que el efecto es visible ya en el primer mes de tratamiento, la determinación del nivel de BiP en una fase temprana del tratamiento puede servir como prueba de evaluación o herramienta para valorar la eficacia del tratamiento y para ayudar a determinar los pasos posteriores del tratamiento para estos pacientes, por ejemplo para determinar si se debe continuar el tratamiento con dTCAPF.

Ejemplo 3

Seguridad y tolerabilidad del péptido dTCAPF

- 50 50 Se analizaron diversos parámetros para los pacientes que participaron en el ensayo clínico mencionado en el Ejemplo 2 anterior, incluyendo la seguridad, PK y la eficacia, como se detalla a continuación.
- 55 55 Seguridad y tolerabilidad
- 60 60 El número medio de ciclos de tratamiento por paciente fue de 3,2 ± 1,4. No se observaron toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en ningún paciente hasta la cohorte 5. Los eventos adversos (AE) se resumen en la Tabla 4. Ninguno estaba relacionado con el fármaco del estudio. La hipertensión, la anemia, los vómitos, la diarrea y el dolor abdominal fueron los AE de grado 2 más notificados, y la hipertensión fue el AE de grado 3 más notificado. Los vómitos fueron el único AE de grado 4, notificado en 1 paciente. La mayoría de los AE se resolvieron por sí mismos. En general, el tratamiento con dTCAPF fue bien tolerado y no hubo toxicidad acumulada. No se alcanzó la MTD.

Farmacocinética

5 Los resultados de PK para el primer día de los ciclos 1 y 2 se resumen en la Tabla 2; $t_{1/2}$, Cmáx y AUC0 se relacionaron linealmente con la dosis. Se observaron concentraciones plasmáticas de dTCapF dependientes de la dosis (Figura 7).

Eficacia

10 Cinco de los 17 pacientes que fueron tratados durante ≥ 3 meses (12, 24 y 48 mg/m²) experimentaron una enfermedad estable (SD) durante todo el período de tratamiento. En particular, un paciente sufría dolor y debilidad en la parte baja de la espalda, aparentemente debido a una neoplasia medular que presionaba la médula espinal, recibía diversos fármacos analgésicos (por ejemplo, tramadol, oxicodona/naloxona, morfina y pregabalina) y utilizaba un andador. Tras 6 meses de tratamientos (12, 24 y 48 mg/m²), la paciente mejoró su marcha sin necesidad de ningún analgésico.

15 20 El análisis de la supervivencia libre de progresión (PFS) reveló que 6 pacientes experimentaron una PFS más larga con los dTCapF en comparación con su régimen anterior y uno tuvo una PFS comparable a la de su régimen anterior (estos valores de PFS se indican en la Tabla 5 arriba en letras negritas). Además, un paciente que no recibió tratamientos previos pudo permanecer con el fármaco del estudio durante 330 días (manchado positivo) (Tabla 5). Un análisis de regresión reveló una correlación estadísticamente significativa entre los cambios en el tamaño del tumor y las dosis de dTCapF administradas (Figura 8).

Ejemplo 4El efecto del péptido dTCapF en las células ST2 inactivas

25 Como se indicó anteriormente, una mayor abundancia del receptor ST2 en las células positivas a ST2 puede facilitar la entrada del péptido dTCapF en estas células. Para examinar más a fondo el efecto de la presencia de receptores ST2 en las células cancerosas sobre la entrada de dTCapF en las células, se prepararon células inactivas (KO) de ST2 y se examinaron los niveles de diversas proteínas en estas células en respuesta a la administración de dTCapF, como se detalla a continuación.

30 35 Las células utilizadas para la inactivación del receptor ST2 fueron células ováricas de mamífero OV90 (adenocarcinoma). Como se ha detallado anteriormente, las células OV90 y las células KO OV90 fueron administradas con dTCapF y luego fueron sometidas a un ensayo de inmunocitoquímica.

40 45 Como es evidente al comparar la Figura 9A (células OV90 de control que no fueron administradas con dTCapF) con la Figura 9B (células OV90 administradas con dTCapF), los dTCapF indujeron la destrucción completa del aparato de Golgi, resultando en tensión del RE. La Figura 9B muestra que el Golgi desapareció, y las proteínas alteradas se acumularon en el RE, lo que a su vez conduce a la tensión del RE. Estos resultados se basan en el análisis de la proteína β -cop, que es una de las proteínas del aparato de Golgi.

50 55 En contraste con los resultados anteriores, como se demuestra en la Figura 9C (control OV90 ST2 KO, no tratado) y en la Figura 9D (células OV90 ST2 KO administradas con el péptido) en las células OV90 ST2 KO, no se observó ningún efecto de los dTCapF en el aparato de Golgi (las flechas señalan el aparato de Golgi intacto).

60 La Figura 10 muestra la evaluación de la expresión de BiP en OV90 y en células OV90 ST2 KO como resultado de la administración de dTCapF. Mientras que en las células OV90 se observa un claro reforzamiento de la tinción de BiP debido al tratamiento con dTCapF, como se muestra al comparar la Figura 10A (sin dTCapF) con la Figura 10B (en presencia de dTCapF), en las células OV90 ST2 KO no hay diferencias en la tinción de BiP como resultado del tratamiento con dTCapF, como se deduce al comparar la Figura 10C y la Figura 10D. Esto significa que las células OV90 ST2 KO no respondieron a los dTCapF y, por tanto, no se indujo a la tensión del RE.

65 Sin querer estar limitado por la teoría, los resultados anteriores demuestran cómo el receptor ST2 está relacionado con la tensión del RE en los pacientes. La mayor sensibilidad de las células positivas a ST2 a los dTCapF y, a su vez, los resultados anteriores, también explican la mayor diferencia en los niveles de expresión de BiP observados en las células positivas a ST2 que se demuestran en la Figura 6.

Ejemplo 5El efecto del péptido dTCapF en las células normales

60 65 El péptido dTCapF se aplicó a células inmunitarias periféricas humanas sanas y sólo se produjo una muerte celular menor, ya que aparentemente las células cancerosas son muy sensibles a la tensión del RE a diferencia de las células sanas normales (datos no mostrados). Por lo tanto, sin querer ceñirse a la teoría, el dTCapF parece afectar selectivamente a las células cancerosas.

Ejemplo 6**El nivel de la CRT del marcador del RE no se correlaciona con la dosis administrada del péptido dTCAPF**

- 5 La calreticulina (CRT) es una chaperona que se expresa bajo condiciones normales en el RE de las células y ayuda al plegamiento de las proteínas recién sintetizadas. Además de los resultados presentados anteriormente, que muestran un aumento del marcador de tensión de BiP del ER como resultado del tratamiento con dTCAPF, también se examinaron los cambios en los niveles séricos de CRT en pacientes humanos tratados con dTCAPF. La dosificación 10 de pacientes con diferentes dosis de dTCAPF (6 mg/mm² - 96 mg/mm²) indujo cambios en los niveles séricos de CRT, sin embargo, sin ninguna correlación con la dosis en la que se administró dTCAPF, a diferencia de los niveles de BiP que mostraron una correlación lineal con la administración de dTCAPF y el tamaño del tumor, como se detalló anteriormente.
- 15 En la Figura 11A se muestra un gráfico de barras que muestra el nivel sérico de CRT al final del tratamiento con dTCAPF en pacientes con cáncer que participan en el estudio clínico descrito anteriormente y en la Figura 11B se muestra un gráfico de barras que muestra el cambio en los niveles séricos de CRT en los pacientes que reciben el tratamiento con dTCAPF.
- 20 En resumen, no se observó ninguna correlación entre la dosis de dTCAPF y el nivel de CRT en suero. Los experimentos *in vitro* realizados en ratones mostraron que los niveles de CRT en las células no se vieron afectados debido al tratamiento con dTCAPF, a diferencia de la BiP, cuyo nivel aumentó como resultado del tratamiento con dTCAPF (datos no mostrados).
- 25 La CRT es una chaperona cuyo nivel no aumenta en las células cuando se tratan con dTCAPF, mientras que el nivel de BiP sí aumenta *in vitro* e *in vivo* tras el tratamiento con dTCAPF. Aunque ambos forman parte del mecanismo de reparación de la tensión del RE, el dTCAPF aumenta selectivamente *in vitro* e *in vivo* la BiP y no influye en los niveles 30 de CRT. La observación de que no se produjo ningún cambio en el nivel de CRT se correlaciona con el cambio de los niveles séricos de BiP y el "no cambio" de CRT. Esto significa que el cambio del nivel de BiP en los pacientes se correlaciona perfectamente con la actividad *in vitro/in vivo* de los dTCAPF.

Ejemplo 7**El péptido dTCAPF activa las células NK**

- 35 Las células asesinas naturales o "células NK" son un tipo de linfocitos citotóxicos fundamentales para el sistema inmunitario innato. El papel de las células NK es análogo al de las células T citotóxicas en la respuesta inmunitaria adaptativa. Entre otras funciones, las células NK proporcionan una respuesta rápida a las células infectadas por virus y responden a la formación de tumores.
- 40 También se examinó el efecto de los dTCAPF sobre las células NK humanas (CD56+CD16+, compradas a Lonza (2W-501)). Las células NK se sembraron en medio LGM-3 (complementado con IL-2 e IL-15). Las células fueron tratadas con dTCAPF durante 24 horas y posteriormente durante 72 horas, seguido de un análisis FACS que se centró en los 45 antígenos CD335 y CD337 (Receptor natural desencadenante de citotoxicidad 1 y Receptor natural desencadenante de citotoxicidad 3, respectivamente). Como se muestra en la Figura 12, los dTCAPF indujeron un aumento de la expresión de ambos receptores.
- 50 Los receptores CD335 y CD337 son importantes para la actividad de las células NK contra las células cancerosas y las células infectadas por virus. La inducción de la actividad de las células NK también se observó durante el ensayo clínico descrito anteriormente para el paciente 006 (que tenía una neoplasia de la médula espinal). Durante el ensayo clínico, las biopsias de los pacientes se tiñeron con anticuerpos específicos contra las células NK humanas antes de su entrada en el ensayo clínico y después de la administración del tratamiento. Se observó una fuerte tinción de las células NK en las biopsias de los pacientes tras ser administrados con dTCAPF (datos no mostrados).

Ejemplo 8**La combinación de dTCAPF con Taxol produce un efecto sinérgico**

- 60 El efecto terapéutico beneficioso del péptido dTCAPF sobre las células cancerosas dio lugar a otro estudio, en el que se administró dTCAPF a las células cancerosas en combinación con un agente terapéutico anticánceroso adicional, concretamente Taxol, en las condiciones descritas anteriormente.
- 65 El Taxol, también conocido como Paclitaxel, es un fármaco quimioterapéutico anticánceroso ("antineoplásico" o "citotóxico"). El paclitaxel está clasificado como un "alcaloide vegetal", un "taxano" y un "agente antimicrotubular" utilizado para el tratamiento de los cánceres de mama, ovario, pulmón, vejiga, próstata, melanoma y esófago, así como otros tipos de tumores sólidos.

El efecto de los agentes administrados se monitorizó mediante un ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), utilizado para detectar la síntesis activa de ADN y, por tanto, la proliferación y viabilidad celular.

5 Se utilizaron dos tipos de células cancerosas para evaluar el efecto combinado del péptido dTCAPF y Taxol, células de cáncer de ovario humano (OV90, Figura 13A) y células de cáncer de páncreas humano (BxPC3, Figura 13B).

10 Cuando se administró Taxol solo a células de cáncer de ovario humano (Figura 13A) o a células de cáncer de páncreas humano (Figura 13B) no se observó ningún efecto sobre la viabilidad celular en comparación con las células de control no tratadas, con base en los resultados del ensayo de incorporación de BrdU realizado.

15 Además, como se muestra en la Figura, 13A cuando el péptido dTCAPF (a 25 µg/ml) se administró solo a células de cáncer de ovario humano no se observó ningún efecto sobre la viabilidad celular en comparación con las células de control no tratadas.

20 15 Sin embargo, cuando el péptido dTCAPF (a 25 µg/ml) se administró en combinación con Taxol (a 2 nM) a células humanas de cáncer de ovario, se observó una disminución de aproximadamente 50 % en la incorporación de BrdU (Figura 13A). Este efecto se vio potenciado por una combinación de dTCAPF (a 25 µg/ml) con Taxol a una concentración de 4 nM, para la que no se observó incorporación de BrdU.

25 20 Además, como se muestra en la Figura, 13B cuando el péptido dTCAPF (25ug/ml) se administró solo a las células de cáncer de páncreas humano, sólo se observó un efecto menor en la viabilidad celular en comparación con las células de control no tratadas. Sin embargo, cuando se administró dTCAPF (a 25 µg/ml) en combinación con Taxol (a 2 nM) a células humanas de cáncer de ovario, se observó una disminución de aproximadamente 20 % en la incorporación de BrdU (Figura 13B). Este efecto fue más pronunciado cuando se utilizó una combinación de dTCAPF a 25 µg/ml con Taxol a una concentración de 4 nM, alcanzando una reducción de más del 40 % en la incorporación de BrdU.

30 25 Estos resultados sugieren un efecto sinérgico del péptido dTCAPF sobre la actividad del Taxol, que por sí mismo no tenía ningún efecto sobre la proliferación, permitiendo así una reducción de la dosis de Taxol utilizada en la quimioterapia. Sin querer ceñirse a la teoría, este efecto sinérgico puede explicarse por la inducción de la tensión del RE por parte de los dTCAPF, como se ha demostrado anteriormente, que contribuye a promover la muerte celular.

LISTA DE SECUENCIAS

35 <110> Immune System Key Ltd.
 <120> TENSIÓN DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO COMO HERRAMIENTA DE PREDICCIÓN EN LA TERAPIA DEL CÁNCER Y UNA TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

40 <130> 2450285
 <150> US 62/291,190
 <151>2016-02-04

45 <160> 1
 <170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> péptido sintético llamado "dTCAPF".

60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> x es igual a D-Trp

65 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> x es igual a D-Trp

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> x es igual a D-Thr
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> x es igual a D-Phe
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> x es igual a D-Phe
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> x es igual a D-Leu
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> x es igual a D-Pro
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> x es igual a D-Ser
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> x es igual a D-Thr
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> x es igual a D-Leu
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> x es igual a D-Trp
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> x es igual a D-Glu
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> x es igual a D-Arg
 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <222> (14)..(14)
 <223> x es igual a D-Lys
 <400>1

Xaa													
1				5								10	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una terapia combinada que comprende un agente anticancerígeno y un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que dicho agente anticanceroso se selecciona de Taxol y doxorrubicina.
- 10 2. La terapia combinada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente anticanceroso es Taxol.
- 10 3. La terapia combinada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho agente anticanceroso es doxorrubicina.
- 15 4. La terapia combinada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho péptido aislado y dicho agente anticanceroso se administran de forma concomitante o consecutiva.
- 20 5. La terapia combinada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de ovario, neoplasia de células fusiformes de origen neural, neoplasia de células fusiformes, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, adenocarcinoma de colon, cáncer rectal, adenocarcinoma rectal, cáncer de pulmón carcinoma de pulmón de células no pequeñas, neoplasia medular, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer renal, mieloma múltiple, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, carcinoma hepático, cáncer de hígado o neoplasias del tracto genital femenino.
- 25 6. La terapia combinada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos denotada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 7. La terapia combinada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que se administra dicho péptido aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:
 - a) a una dosis de 5 mg/m² a 100 mg/m², y/o
 - b) con una frecuencia de una, dos o tres veces por semana.
- 35 8. Un kit terapéutico que comprende:
 - (a) un agente anticanceroso seleccionado de Taxol y doxorrubicina; y
 - (b) un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO. 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho péptido aislado,
- 40 9. El kit terapéutico de la reivindicación 8, en el que dicho agente anticanceroso es Taxol.
- 40 10. El kit terapéutico de la reivindicación 8, en el que dicho agente anticanceroso es doxorrubicina.

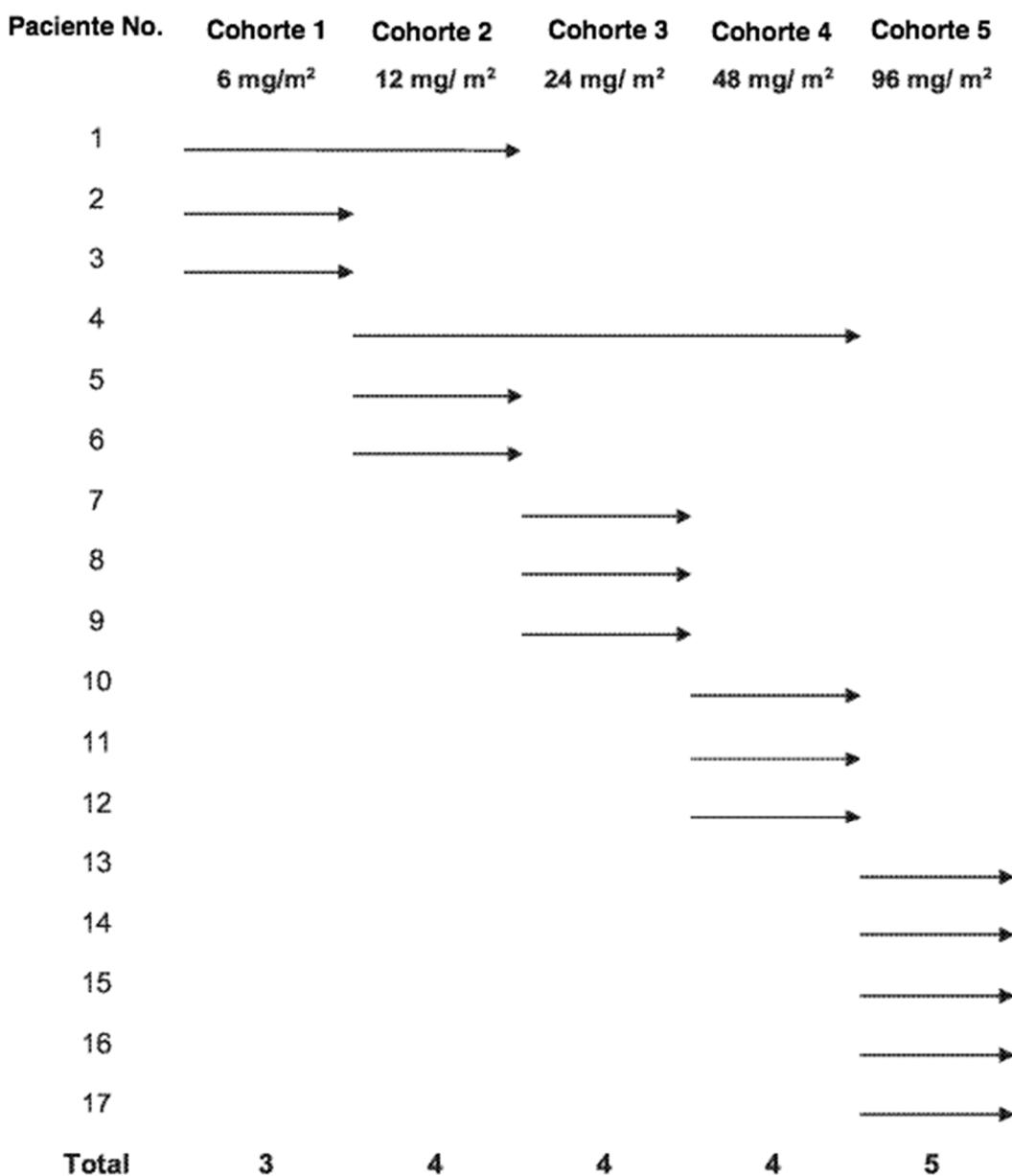


Fig. 1

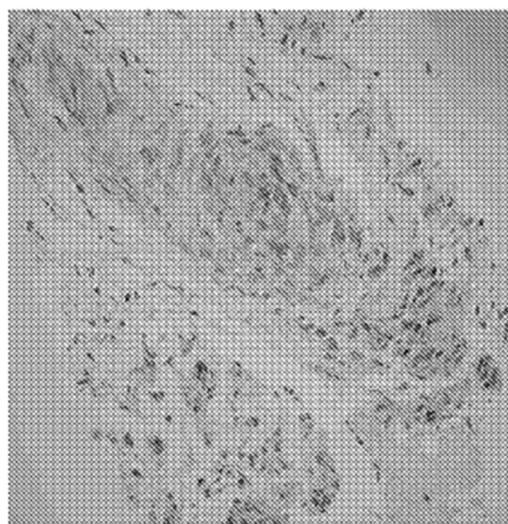


Fig. 2A

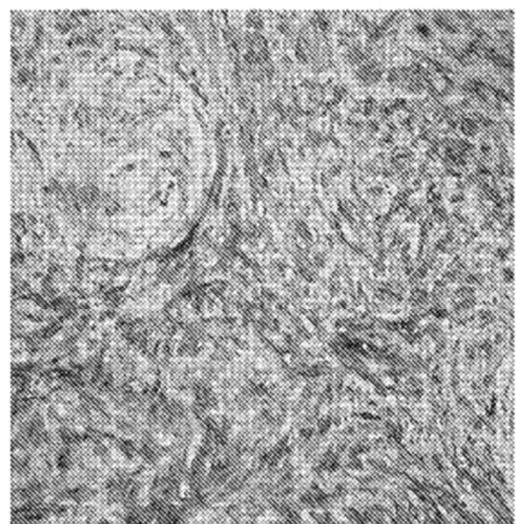


Fig. 2B

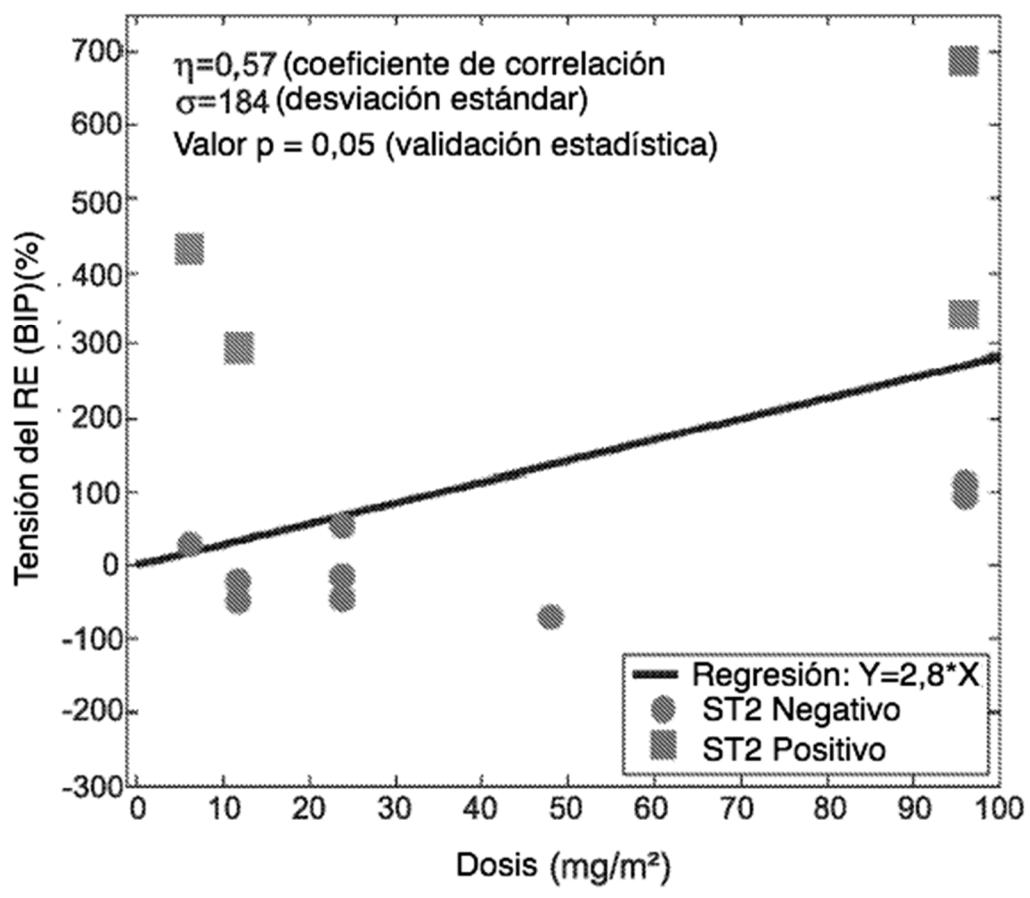


Fig. 3

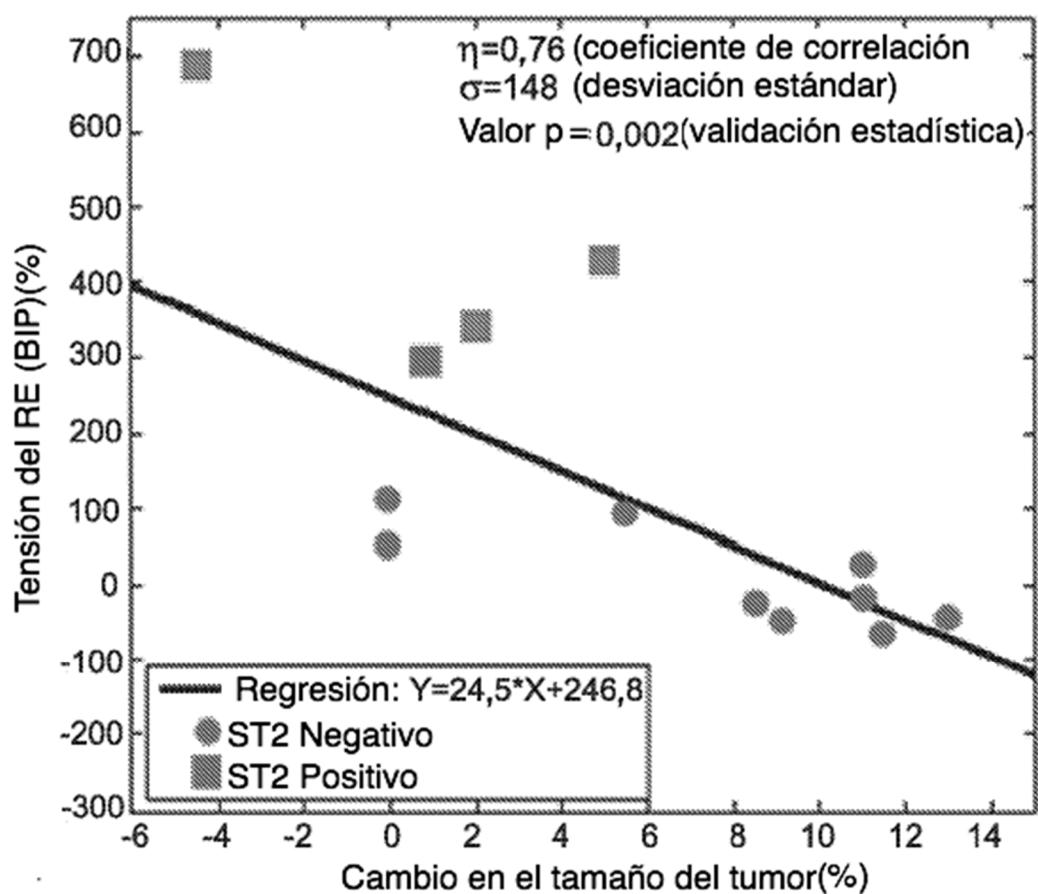


Fig. 4

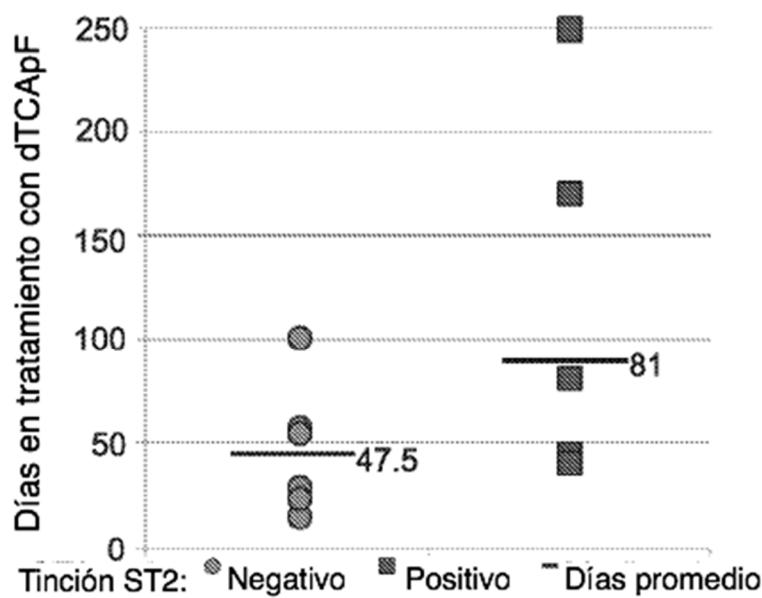
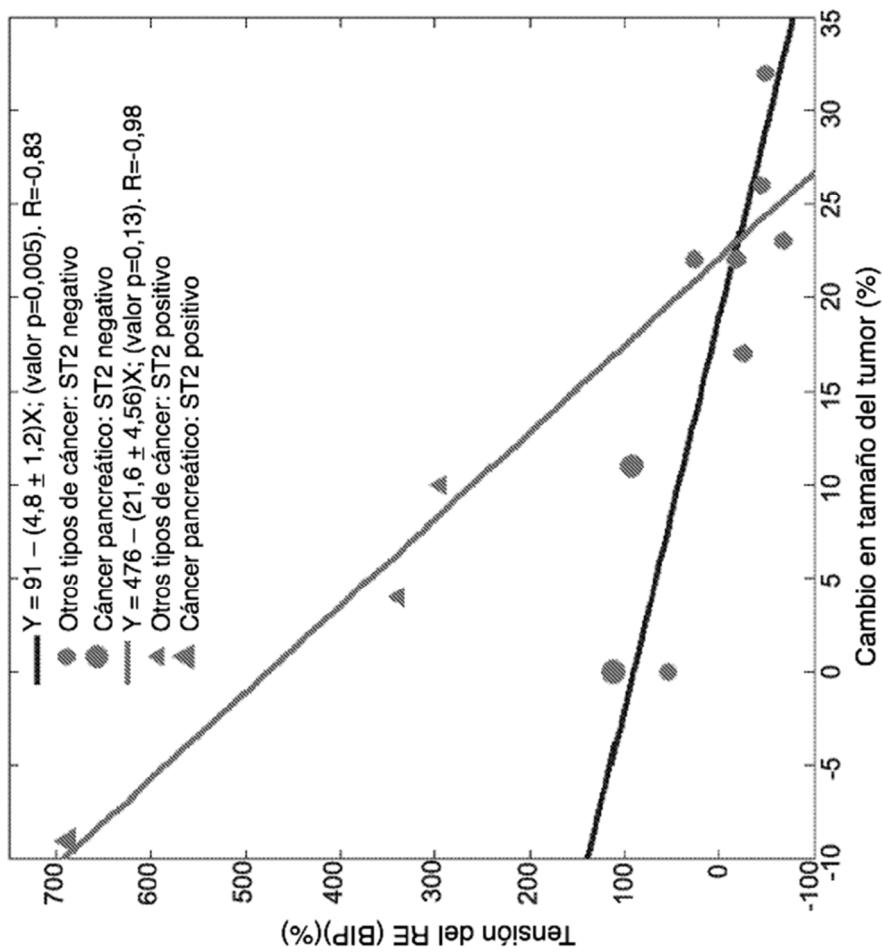


Fig. 5

6
正



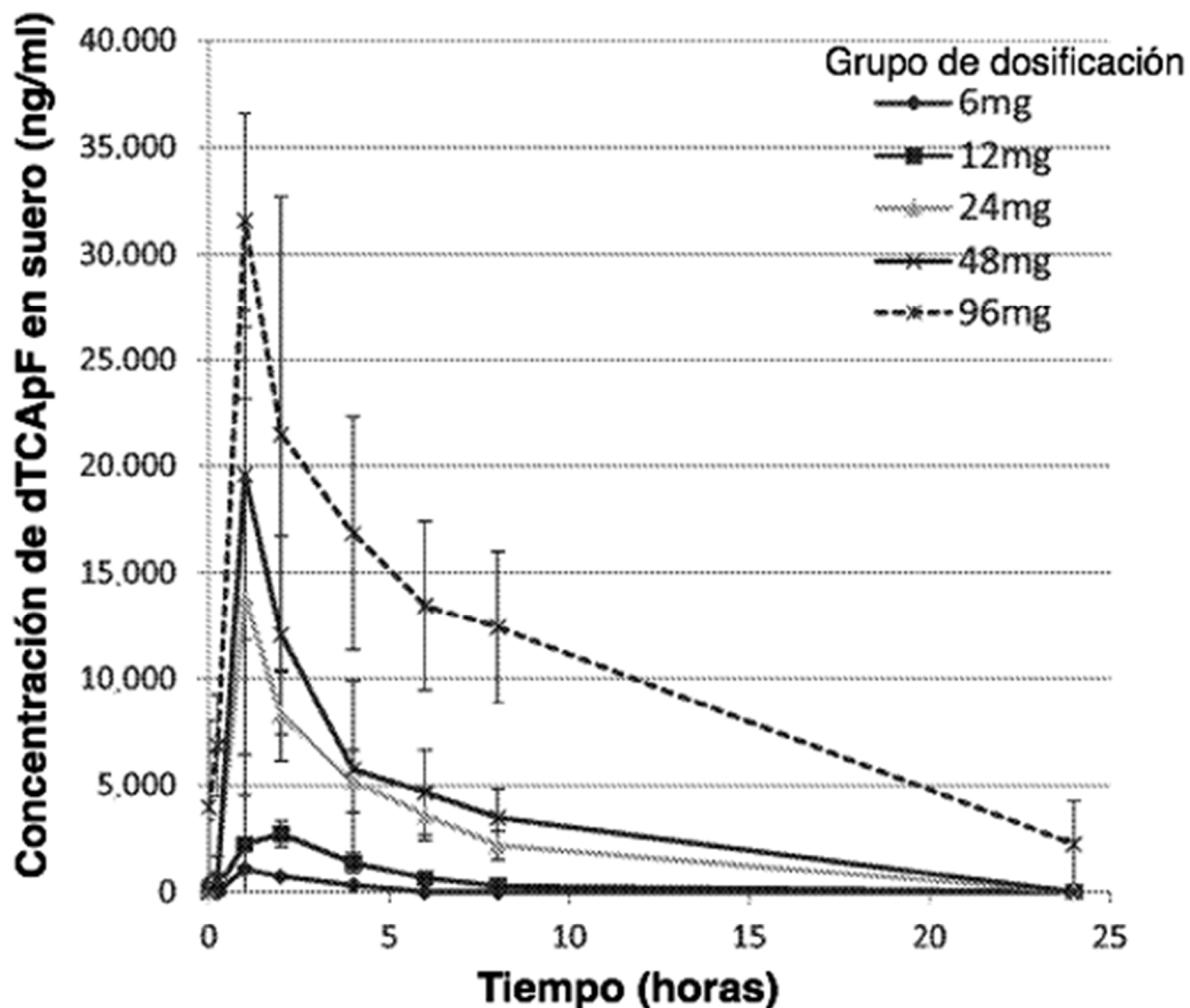
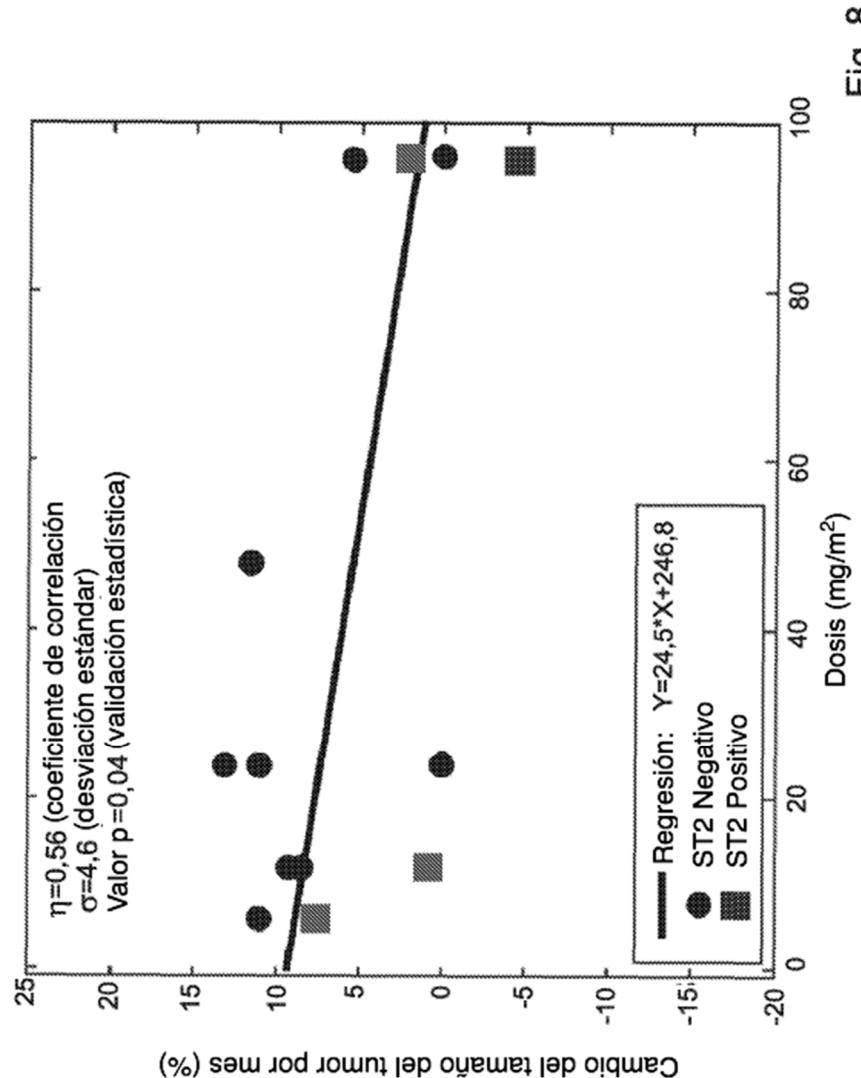
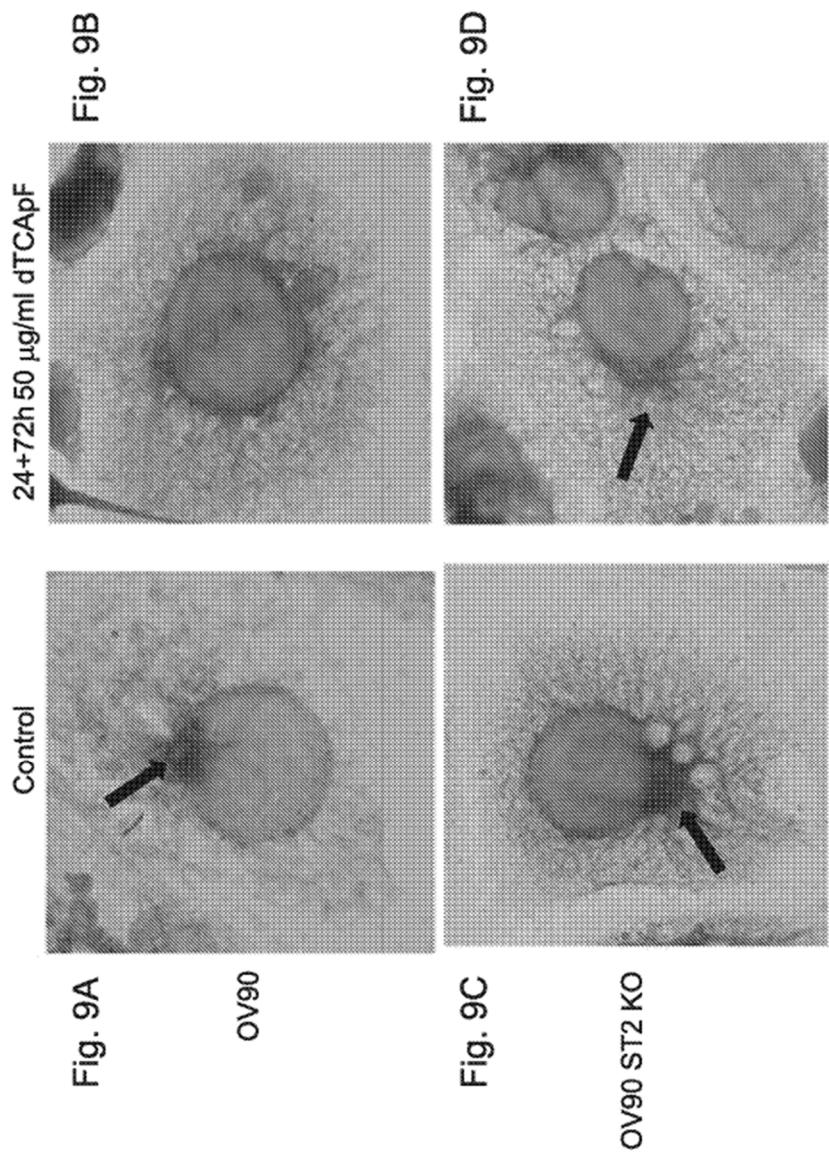
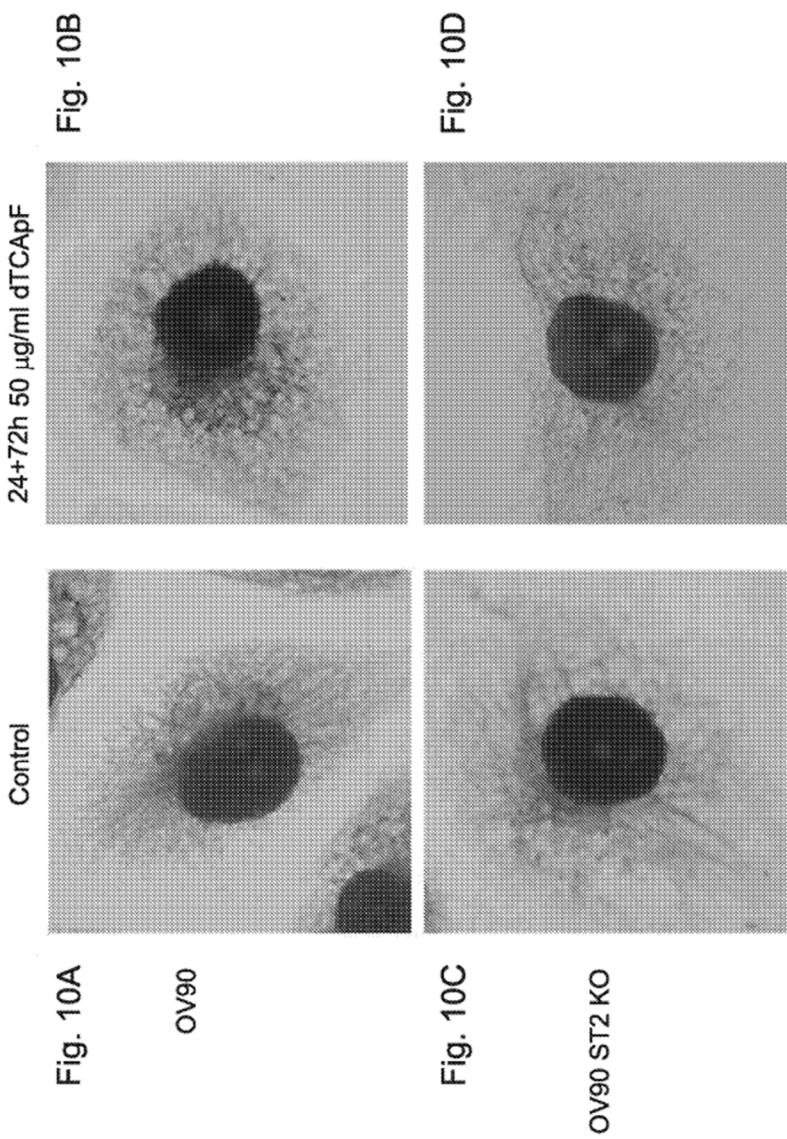


Fig. 7



8
正





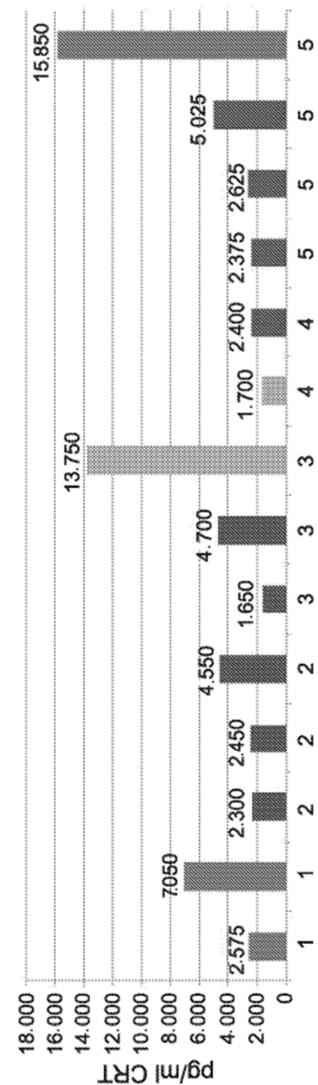


Fig. 11A

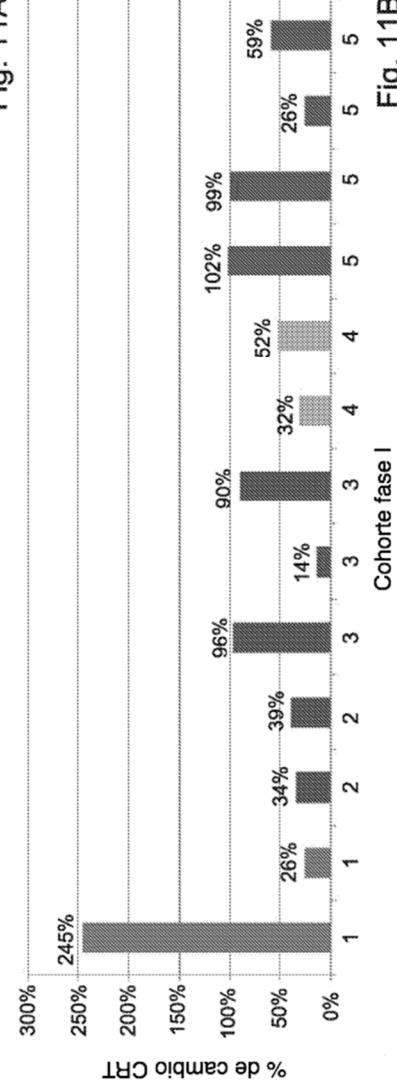


Fig. 11B

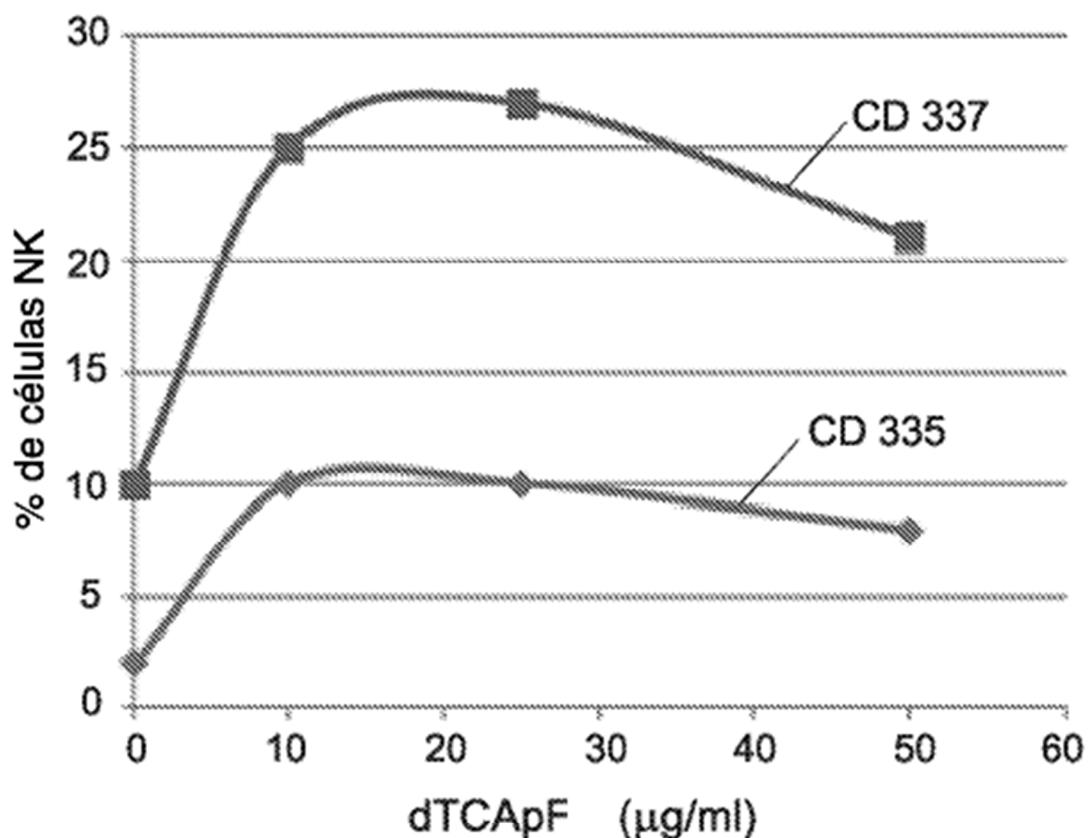


Fig. 12

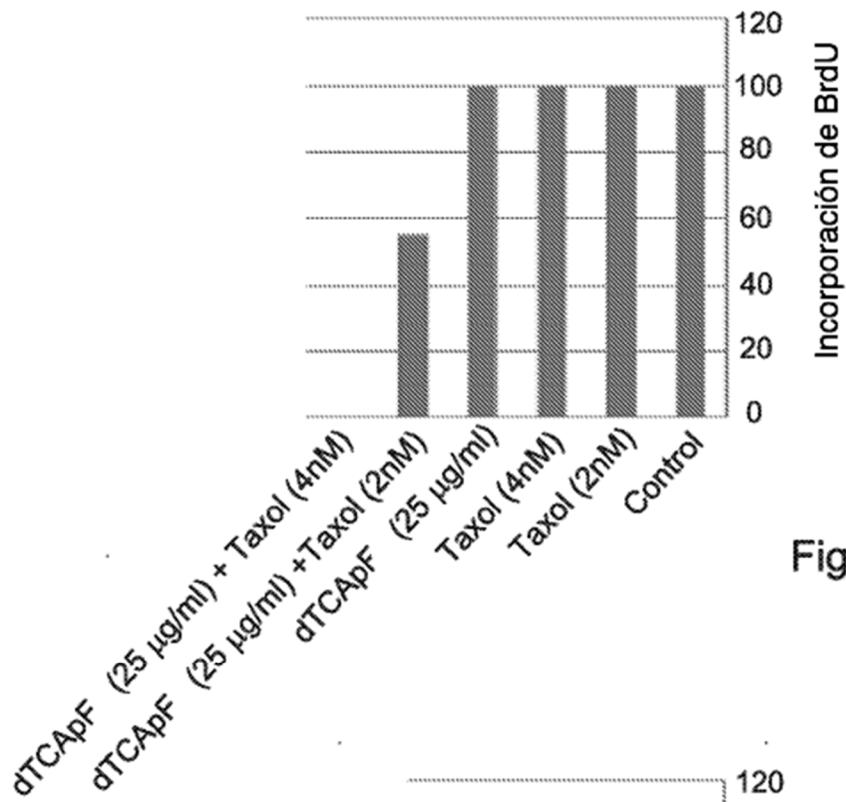


Fig. 13A

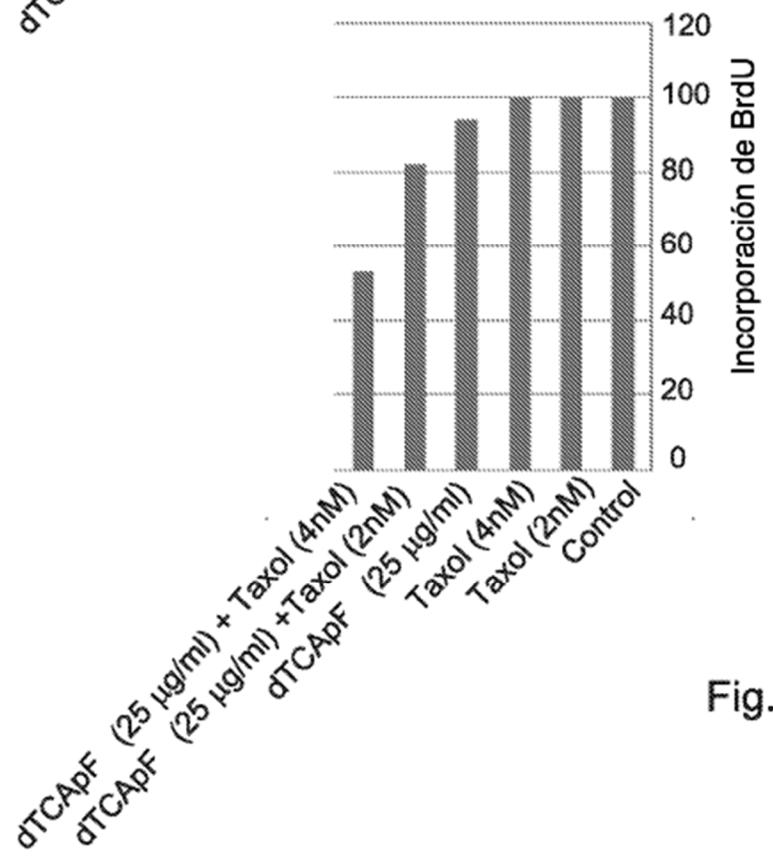


Fig. 13B